

Universidade de Lisboa
Faculdade de Ciências
Departamento de Química e Bioquímica



**Desenvolvimento e Validação de um Método Analítico para Análise de
Medicamentos por GC-MS em Amostras Biológicas *Post-mortem* com
Recurso a QuEChERS**

David Duarte Lopes Pereira

Dissertação orientada
pelo Professor Doutor Carlos Manuel Ferreira de Sousa Borges
e pela Mestre Maria Suzel Costa de Sousa

Mestrado em Química
Química Analítica

2015

*"The presence of a poison must be proved in
the blood and organs before it can be
considered as a cause of death"*

– Orfila's Maxim

Prefácio

A pesquisa de medicamentos em amostras biológicas corresponde a uma grande parte do trabalho desenvolvido num serviço de química e toxicologia em contexto forense, daí ser importante a existência de metodologias simples, rápidas e fiáveis para a sua extração e análise. O sangue e a urina são as amostras tipicamente analisadas, contudo existem situações em que estas não estão disponíveis ou não é possível a sua análise, sendo necessário recorrer a amostras alternativas como o fígado. Para a análise deste tipo de amostra é essencial um método extrativo adequado e, por isso, pretende-se com esta dissertação desenvolver uma metodologia analítica, com recurso a uma extração por QuEChERS, que seja aplicada à análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS) de medicamentos em amostras de fígado *post-mortem* na rotina de um serviço de química e toxicologia forenses.

A parte experimental desta dissertação decorreu nas instalações do Serviço de Química e Toxicologia Forenses (SQTF) da Delegação do Sul do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P. (INMLCF), resultante de uma colaboração deste com a Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

O objetivo geral desta dissertação consistia em desenvolver uma metodologia analítica para identificação e quantificação de medicamentos das classes dos analgésicos estupefacientes, dos anticoagulantes e antitrombóticos, dos antidepressores e dos antipsicóticos, em amostras de fígado *post-mortem* com recurso a extração por QuEChERS. Mais detalhadamente os objetivos deste trabalho consistiam em:

- i) Desenvolver e otimizar um procedimento de extração de medicamentos (amitriptilina, ciamemazina, citalopram, clomipramina, clozapina, fluoxetina, haloperidol, levomepromazina, mirtazapina, olanzapina, sertralina, tiapride, ticlopidina, tramadol, trazodona e venlafaxina) de amostras de fígado *post-mortem* utilizando a metodologia QuEChERS;
- ii) Otimizar e validar um método analítico para identificação e quantificação dos medicamentos mencionados no ponto i) por GC-MS em amostras de fígado *post-mortem*, extraídos recorrendo a QuEChERS;
- iii) Analisar amostras reais que demonstrem a aplicabilidade do método analítico desenvolvido.

O trabalho foi alvo de divulgação na comunidade científica, através de comunicações em painel (*poster*) e oral em diversos congressos e conferências, nacionais e internacionais.

Comunicações em *poster*

- **"Desenvolvimento de um método analítico para análise de medicamentos por GC-MS em amostras biológicas *post-mortem* com recurso a QuEChERS"**, I Conferência do Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, 30 e 31 de outubro de 2014, Coimbra, Portugal.
- **"Development, optimization and validation of an analytical method for the analysis of drugs by GC-MS in *post-mortem* liver samples using QuEChERS for sample preparation"**, 53rd TIAFT Meeting 2015, 30 de agosto a 4 de setembro de 2015, Florença, Itália.

Comunicação oral

- **"Desenvolvimento e optimização de um método analítico para análise de medicamentos por GC-MS em amostras de fígado *post-mortem* com recurso a QuEChERS"**, II Jornadas Ibéricas de Toxicologia, 13 a 15 de novembro de 2014, Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal.

Distinções

- **Melhor comunicação oral** com o título: "Desenvolvimento e optimização de um método analítico para análise de medicamentos por GC-MS em amostras de fígado *post-mortem* com recurso a QuEChERS", apresentada nas II Jornadas Ibéricas de Toxicologia, 13 a 15 de novembro de 2014, Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade da Beira Interior, Covilhã, Portugal.

Agradecimentos

De uma forma geral agradeço a todas as pessoas que, direta ou indiretamente, me apoiaram e ajudaram, ou de alguma forma contribuíram para a realização desta dissertação.

Agradeço à instituição que me proporcionou a possibilidade de realizar esta dissertação nas suas instalações em excelentes condições de trabalho, o SQTF do INMLCF, I.P., em especial aos seus Diretores, Dr. João Miguel Franco e Dr. Mário João Dias, respetivamente, por me terem proporcionado esta oportunidade e por toda a preocupação, disponibilidade, ajuda e pelo interesse demonstrado neste trabalho.

Um agradecimento especial a todos os colaboradores do SQTF, Dr. António Castañera, Dr. Francisco Vale, Dr. Nuno Gonçalves, Dra. Susana Simões, Elsa Rodrigues, Luísa Almeida e Paula Rodrigues por todos os ensinamentos e pela simpatia, disponibilidade e paciência demonstrada ao longo deste período.

À Dra. Suzana Fonseca uma palavra especial de gratidão, por tudo o que fez por mim, a sua disponibilidade e paciência em responder a todas as minhas dúvidas, pela sua preocupação e interesse pelo meu trabalho, por todas as ideias de melhoramento do mesmo e, essencialmente, pela sua amizade, simpatia e amabilidade em todos aqueles dias de tratamento de resultados.

Ao Doutor Mário Barroso agradeço a disponibilidade para me ajudar e responder às minhas dúvidas, por me apoiar e esclarecer acerca da validação do método e de todos os problemas que iam surgindo, pelas opiniões e palavras de incentivo que em momentos de tensão tornavam tudo mais calmo e simples e por todo o tempo despendido na ajuda de revisões e correções de trabalhos escritos.

Ao meu orientador, Professor Doutor Carlos Manuel Borges, agradeço por ter aceite a orientação desta dissertação, pelo seu auxílio, pelos seus conselhos e pela sua disponibilidade e preocupação.

À minha orientadora, Mestre Maria Suzel Costa, um agradecimento especial por ter aceite a orientação desta dissertação quando não tinha qualquer obrigação de o fazer. Agradeço por toda a sua disponibilidade e paciência, por todo o apoio e incentivo, pelas críticas construtivas, pelos elogios, pelas oportunidades e desafios lançados e por me fazer ir sempre mais além, fazendo-me acreditar nas minhas capacidades. Agradeço ainda pela sua simpatia, pela sua capacidade de me fazer sentir à vontade, pelos momentos de descontração, essencialmente, pela sua amizade.

Aos professores que sempre me incentivaram a lutar pelos meus objetivos e a nunca desistir e que me fizeram acreditar nas minhas capacidades.

Agradeço aos meus amigos por todo o apoio e preocupação. Ao André, à Cathy e à Mariana um obrigado muito especial por estarem sempre presentes mesmo estando longe, por me incentivarem, por ouvirem os meus desabafos quando as coisas corriam menos bem e por me fazerem continuar a lutar.

Não posso deixar de agradecer à minha família, em especial às pessoas mais importantes da minha vida, os meus pais e o meu irmão, pois sem eles dificilmente teria conseguido chegar onde cheguei até agora e conseguido ultrapassar mais uma etapa da minha vida. Agradeço também à “tia” Rosário por me aturar durante todo este ano.

Índice Geral

PREFÁCIO.....	I
AGRADECIMENTOS.....	III
ÍNDICE GERAL.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE GRÁFICOS	IX
ÍNDICE DE TABELAS.....	XI
ABREVIATURAS, ACRÓNIMOS E SÍMBOLOS.....	XIII
PALAVRAS-CHAVE.....	XVII
RESUMO.....	XVII
KEYWORDS.....	XIX
ABSTRACT	XIX
I. INTRODUÇÃO TEÓRICA.....	1
1. Introdução.....	2
2. Substâncias Medicamentosas.....	5
2.1 Analgésicos estupefacientes.....	7
2.1.1 Tramadol	8
2.2 Anticoagulantes e antitrombóticos.....	9
2.2.1 Ticlopidina	10
2.3 Antidepressores.....	10
2.3.1 Antidepressores tricíclicos e afins (TCA)	12
2.3.2 Antidepressores inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS)	14
2.3.3 Antidepressores inibidores seletivos da recaptação de serotonina e de noradrenalina (ISRSN)	16
2.3.4 Antidepressores inibidores seletivos da recaptação de serotonina / antagonistas dos recetores 2A de serotonina (SARI).....	17
2.4 Antipsicóticos	18
3. Amostras biológicas	23
3.1 Fígado.....	24

4.	Preparação de amostras biológicas	26
5.	QuEChERS.....	31
6.	Homogeneização da amostra	33
7.	Validação do método	34
II.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
1.	Reagentes.....	38
2.	Soluções	39
3.	Equipamentos	41
4.	Condições Cromatográficas	42
5.	Amostras biológicas em estudo.....	42
6.	Identificação dos compostos	43
7.	Metodologia.....	45
7.1	Extração QuEChERS.....	45
7.1.1	Pré-tratamento da Amostra	45
7.1.2	Metodologia de Extração em Fase Única.....	45
7.1.3	Metodologia de Extração em Fase Sólida dispersiva	45
7.1.4	Concentração	45
8.	Quantificação	46
8.1	Seleção do Padrão Interno	46
9.	Estratégia de otimização do método	47
9.1	Extração em Fase Única.....	47
9.1.1	Solvente de extração e acidificação.....	47
9.1.2	Adição de Sais, agitação e separação de fases/partição líquido-líquido.....	48
9.2	d-SPE	49
10.	Validação do método	49
10.1	Especificidade/Seletividade.....	50
10.2	Capacidade de Identificação.....	52
10.3	Avaliação do Efeito de Matriz	52
10.4	Linearidade ou modelo de calibração	53
10.4.1	Gama de trabalho	55
10.4.2	Regressão linear ponderada.....	56
10.5	Limite de Detecção (LOD)	58
10.6	Limite de Quantificação (LOQ).....	59
10.7	Eficiência da Extração (Recuperação)	59
10.8	Precisão: Repetibilidade e Precisão Intermédia.....	60
10.9	Exatidão.....	64
10.10	Arrastamento (do inglês <i>Carryover</i>).....	65

10.11	Robustez.....	66
III.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	67
1.	Estratégia de otimização do método	68
1.1	Extração em Fase Única.....	68
1.1.1	Tipo de solvente de extração	68
1.1.2	Volume de solvente de extração.....	69
1.1.3	Percentagem de ácido acético no solvente de extração.....	70
1.1.4	Quantidade de sais (MgSO_4 e $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ (4:1)) adicionada na Extração em Fase Única.....	71
1.1.5	Tempo de agitação na Extração em Fase Única	72
1.1.6	Tempo de centrifugação na Extração em Fase Única	73
1.2	d-SPE	74
1.2.1	Composição de adsorventes utilizados na d-SPE.....	74
1.2.2	Tempo de agitação na d-SPE.....	75
1.2.3	Tempo de centrifugação na d-SPE.....	76
1.3	Considerações finais sobre a otimização do método	77
2.	Validação.....	78
2.1	Especificidade/Seletividade e Capacidade de Identificação	78
2.2	Avaliação do Efeito de Matriz	80
2.3	Linearidade.....	80
2.3.1	Gama de trabalho.....	82
2.3.2	Regressão linear ponderada.....	83
2.4	Limite de Detecção	87
2.5	Limite de Quantificação	88
2.6	Recuperação (Eficiência da Extração)	88
2.7	Precisão (Repetibilidade e Precisão intermédia) e Exactidão	90
2.8	Arrastamento (do inglês <i>carryover</i>)	94
2.9	Robustez.....	95
IV.	ANÁLISE DE AMOSTRAS REAIS.....	97
V.	CONCLUSÃO	101
VI.	PERSPETIVAS FUTURAS.....	105
VII.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	107
VIII.	ANEXOS.....	117
1.	Anexo A.....	118
2.	Anexo B.....	119
3.	Anexo C.....	121
4.	Anexo D.....	122

Índice de Figuras

Figura 1. Estrutura química do tramadol.....	8
Figura 2. Estrutura química da ticlopidina.	10
Figura 3. Estrutura química geral dos TCA, representada pela amitriptilina.	12
Figura 4. Estruturas químicas dos TCA em estudo: (A) amitriptilina; (B) clomipramina; (C) mirtazapina.	13
Figura 5. Estruturas químicas dos ISRS em estudo: (A) citalopram; (B) fluoxetina; (C) sertralina.	14
Figura 6. Estrutura química da venlafaxina.....	16
Figura 7. Estrutura química da trazodona.	17
Figura 8. Estruturas químicas dos antipsicóticos em estudo: (A) ciamemazina; (B) clozapina; (C) Levomepromazina; (D) Olanzapina; (E) Tiapride; (F) haloperidol.....	20
Figura 9. Separação de fases na Extração em Fase Única.	31
Figura 10. Processo de homogeneização das amostras de fígado.	33
Figura 11. Cromatogramas obtidos no estudo da especificidade/seletividade numa MACRO desenvolvida internamente: (A) alíquota de <i>pool</i> de fígado não fortificada com os analitos em estudo; (B) alíquota da mesma <i>pool</i> de fígados fortificada com os analitos em estudo.	79
Figura 12. Distribuição do ER% em função da concentração de ciamemazina obtida para os vários fatores de ponderação.....	85
Figura 13. MACRO obtida na análise da amostra real B.....	99
Figura 14. Confirmação qualitativa da presença do tramadol na amostra real B.	100
Figura 15. Confirmação quantitativa do tramadol na amostra real B.	100
Figura 16. Tratamento estatístico aplicado no estudo da linearidade (tendo como exemplo a ciamemazina).....	121
Figura 17. Confirmação qualitativa da presença de ciamemazina no calibrador mais baixo da gama de trabalho.	122

Índice de Gráficos

Gráfico 1.1.1-A. Áreas dos picos cromatográficos dos iões de quantificação dos medicamentos em estudo para otimização do solvente de extração.....	68
Gráfico 1.1.1-B. Áreas dos picos cromatográficos dos iões de quantificação dos medicamentos em estudo para otimização do solvente de extração.....	68
Gráfico 1.1.2-A. Razões entre as áreas dos picos cromatográficos dos iões de quantificação dos medicamentos em estudo e a área do pico cromatográfico do PI para a otimização do volume de solvente de extração.....	69
Gráfico 1.1.2-B. Razões entre as áreas dos picos cromatográficos dos iões de quantificação dos medicamentos em estudo e a área do pico cromatográfico do PI para otimização do volume de solvente de extração.....	69
Gráfico 1.1.3-A. Razões entre as áreas dos picos cromatográficos dos iões de quantificação dos medicamentos em estudo e a área do pico cromatográfico do PI para otimização da percentagem de ácido no solvente de extração.....	70
Gráfico 1.1.3-B. Razões entre as áreas dos picos cromatográficos dos iões de quantificação dos medicamentos em estudo e a área do pico cromatográfico do PI para otimização da percentagem de ácido no solvente de extração.....	70
Gráfico 1.1.4-A. Razões entre as áreas dos picos cromatográficos dos iões de quantificação dos medicamentos em estudo e a área do pico cromatográfico do PI para otimização da quantidade de sais adicionada na Extração em Fase Única.....	71
Gráfico 1.1.4-B. Razões entre as áreas dos picos cromatográficos dos iões de quantificação dos medicamentos em estudo e a área do pico cromatográfico do PI para otimização da quantidade de sais adicionada na Extração em Fase Única.....	72
Gráfico 1.1.5-A. Razões entre as áreas dos picos cromatográficos dos iões de quantificação dos medicamentos em estudo e a área do pico cromatográfico do PI para otimização do tempo de agitação na Extração em Fase Única.	72
Gráfico 1.1.5-B. Razões entre as áreas dos picos cromatográficos dos iões de quantificação dos medicamentos em estudo e a área do pico cromatográfico do PI para otimização do tempo de agitação na Extração em Fase Única.	73
Gráfico 1.1.6-A. Razões entre as áreas dos picos cromatográficos dos iões de quantificação dos medicamentos em estudo e a área do pico cromatográfico do PI para otimização do tempo de centrifugação na Extração em Fase Única.	73
Gráfico 1.1.6-B. Razões entre as áreas dos picos cromatográficos dos iões de quantificação dos medicamentos em estudo e a área do pico cromatográfico do PI para otimização do tempo de centrifugação na Extração em Fase Única.	74
Gráfico 1.2.1-A. Razões entre as áreas dos picos cromatográficos dos iões de quantificação dos medicamentos em estudo e a área do pico cromatográfico do PI para otimização da composição de adsorventes utilizados na d-SPE.....	75
Gráfico 1.2.1-B. Razões entre as áreas dos picos cromatográficos dos iões de quantificação dos medicamentos em estudo e a área do pico cromatográfico do PI para otimização da composição de adsorventes utilizados na d-SPE.....	75

Gráfico 1.2.2-A. Razões entre as áreas dos picos cromatográficos dos iões de quantificação dos medicamentos em estudo e a área do pico cromatográfico do PI para otimização do tempo de agitação na d-SPE.	76
Gráfico 1.2.2-B. Razões entre as áreas dos picos cromatográficos dos iões de quantificação dos medicamentos em estudo e a área do pico cromatográfico do PI para otimização do tempo de agitação na d-SPE.	76
Gráfico 1.2.3-A. Razões entre as áreas dos picos cromatográficos dos iões de quantificação dos medicamentos em estudo e a área do pico cromatográfico do PI para otimização do tempo de centrifugação na d-SPE.	77
Gráfico 1.2.3-B. Razões entre as áreas dos picos cromatográficos dos iões de quantificação dos medicamentos em estudo e a área do pico cromatográfico do PI para otimização do tempo de centrifugação na d-SPE.	77

Índice de Tabelas

Tabela 1. Propriedades físico-químicas e concentrações terapêuticas, tóxicas e letais dos medicamentos em estudo.	6
Tabela 2. Efeitos correspondentes à atuação sobre os recetores opióides.	7
Tabela 3. Tipos de amostras biológicas. (75,77)	24
Tabela 4. Métodos de extração e técnicas analíticas utilizadas para análise dos medicamentos em estudo presentes em amostras biológicas.	28
Tabela 5. Continuação dos métodos de extração e técnicas analíticas utilizadas para análise dos medicamentos em estudo em amostras biológicas.	29
Tabela 6. Continuação dos métodos de extração e técnicas analíticas utilizadas para análise dos medicamentos em estudo em amostras biológicas.	30
Tabela 7. Iões monitorizados (sublinhado encontra-se o ião utilizado na quantificação) e tempo de retenção esperado para cada medicamento em estudo.....	43
Tabela 8. Intervalos máximos de tolerância permitidos para as intensidades relativas dos iões de diagnóstico, monitorizados em modo SIM.....	44
Tabela 9. Parâmetros de validação do método analítico de confirmação e quantificação por GC-MS de medicamentos em amostras de fígado <i>post-mortem</i> com recurso a extração por QuEChERS.....	50
Tabela 10. Gama de trabalho e calibradores utilizados para cada um dos analitos em estudo.	56
Tabela 11. Concentrações (gamas baixa, média e alta) dos controlos utilizados no estudo da precisão e da exatidão.....	63
Tabela 12. Análise de variância: tabela ANOVA. (124,149,150).....	63
Tabela 13. Cálculo das estimativas das variâncias para o modelo experimental utilizado no estudo da repetibilidades e da precisão intermédia. (124,149,150).....	64
Tabela 14. Resultados da avaliação do efeito de matriz para os medicamentos em estudo.....	80
Tabela 15. Resumo dos resultados obtidos pelo método de regressão linear para os medicamentos em estudo.	81
Tabela 16. Resumo dos resultados obtidos para o Teste de Mandel para os medicamentos em estudo.....	82
Tabela 17. Resumo dos resultados obtidos no teste de homogeneidade de variâncias para os medicamentos em estudo.	83
Tabela 18. ER% por recurso à regressão linear simples e ponderada para cada fator de ponderação, referente à ciamemazina.	86
Tabela 19. Resumo dos resultados obtidos relativamente ao fator de ponderação mais adequado para os medicamentos em estudo.....	86
Tabela 20. LOD e LOQ do método extrativo QuEChERS em amostras de fígado <i>post-mortem</i> desenvolvido neste trabalho e comparação com LOD e LOQ publicados na literatura para os medicamentos em estudo.....	89
Tabela 21. Recuperação média, em percentagem, da fase de extração, para cada um dos medicamentos em estudo, determinada para três níveis de concentração.	90
Tabela 22. Resumo dos resultados obtidos para a repetibilidade do método.....	91

Tabela 23. Continuação do resumo dos resultados obtidos para a repetibilidade do método.	92
Tabela 24. Resumo dos resultados obtidos para a precisão intermédia e a exatidão do método, para três gamas de concentração.	93
Tabela 25. Dados do estudo quantitativo do fenómeno de arrastamento.....	94
Tabela 26. Resumo dos resultados obtidos na análise de amostras reais.	99
Tabela 27. Compostos analisados na avaliação de interferências na identificação dos analitos em estudo aquando da avaliação da especificidade/selectividade e da capacidade de identificação.	118
Tabela 28. Resultados obtidos para as amostras fortificadas com amitriptilina referentes ao estudo da especificidade/seletividade e da capacidade de identificação do método.	119
Tabela 29. Continuação dos resultados obtidos para as amostras fortificadas com amitriptilina referentes ao estudo da especificidade/seletividade e da capacidade de identificação do método.	120
Tabela 30. Precisão (repetibilidade) e Exatidão determinada para a ciamemazina.....	122

Abreviaturas, Acrónimos e Símbolos

5-HT_{2A} – Recetor da serotonina

Ac Etilo – Acetato de Etilo

ACN – Acetonitrilo

ADP – Adenosina Difosfato

ANOVA – Análise de Variância

C18 – do inglês *octadecyl-modified silica*

C18EC – Adsorvente C18 *Endcapped*

C_{amo} – concentração real na amostra

C_{est} – concentração estimada na amostra

CIAV – Centro de Informação Antivenenos

CV% – Coeficiente de variação percentual

CV_R – Coeficiente de variação da repetibilidade

CV_{SI} – Coeficiente de variação da precisão intermédia

D₂, D₃, D₄ – Recetores de dopamina

d-SPE – Extração em Fase Sólida dispersiva

DAD – Detetor de fotodíodos

EMA – *European Medicines Agency*

EMR – Erro médio relativo

ER% – Erro Relativo percentual

EUA – Estados Unidos da América

F_{cal} – valor do Teste de Mandel

F_{crit} – Valor tabelado da distribuição F de *Snedecor* para (N-1;N-1;α)

FDA – *Food and Drug Administration*

FL – Detetor de Fluorescência

GC – Cromatografia Gasosa

GCB – do inglês *Graphitized Carbon Black*

GC-MS – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa

GC-NPD – Cromatografia Gasosa acoplada a detetor de fósforo e azoto

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HPLC-MS/MS – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massa *Tandem*

HPLC-PDA-FL – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada com detetores de *Photodiode-array* e de Fluorescência

HPLC-UV – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detetor de ultravioleta

HPLC-UV/DAD – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detetores ultravioleta e de fotodíodos

ICH – *International Conference on Harmonisation*

INE – Instituto Nacional de Estatística

INEM – Instituto Nacional de Emergência Médica

Infarmed – Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P.

INMLCF, I.P. – Instituto Nacional de Medicina Legal e Ciências Forenses, I.P.

ISRS – Antidepressores inibidores seletivos da recaptação de serotonina

ISRSN – Antidepressores inibidores da recaptação da serotonina e da noradrenalina

IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*

LC – Cromatografia Líquida

LC-MS – Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa

LC-MS/MS – Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa *Tandem*

LLE – Extração Líquido-Líquido

LOD – Limite de Detecção

LOQ – Limite de Quantificação

IMAO – Antidepressores inibidores da monoamina oxidase

MS – Espectrometria de Massa

MS/MS – Espectrometria de Massa *Tandem*

m/z – razão massa/carga

n.d. – não definido

N-1 – Graus de liberdade

NPD – Detetor de Azoto e Fósforo

PDA – do inglês *Photodiode-array Detection*

PG – teste de homogeneidade de variâncias

pH – logaritmo negativo da concentração hidrogeniónica

PI – Padrão Interno

pka – Constante de ionização

PP – Precipitação de Proteínas

PSA – do inglês *Primary Secondary Amine*

QuEChERS – acrónimo inglês de *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*

r – coeficiente de correlação
 R – repetibilidade
 R^2 – coeficiente de determinação
 Relacre – Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal
 Rpm – Rotações por minuto
 S/N – Razão sinal/ruído
 SARI – Antidepressores inibidores seletivos da recaptação de serotonina / antagonistas dos recetores 2A da serotonina
 SI – Precisão Intermédia
 S_i^2 – variância associada ao calibrador
 S_f^2 – variância da precisão intermédia
 SIM – Monitorização Seletiva de Iões
 SNC – Sistema Nervoso Central
 SNS – Sistema Nacional de Saúde
 SPE – Extração em Fase Sólida
 SPME – Micro-extração em Fase Sólida
 SQTF – Serviço de Química e Toxicologia Forenses
 S_R^2 – variância de repetibilidade
 $S_{y/x}$ – Desvio-padrão residual, erro-padrão
 $S_{y/x}^2$ – variância da correlação linear
 S_{y2}^2 – variância da correlação não linear (quadrática)
 $T_{1/2}$ – Tempo de semi-vida
 TCA – Antidepressivos Tricíclicos
 t_{crit} – valor tabelado da distribuição de *t Student* para $(N-1; N-1; \alpha)$
 TGI – Trato Gastrointestinal
 T_r – Tempo de retenção
 T_{rR} – Tempo de retenção relativo
 UHPLC – Cromatografia Líquida de ultra-eficiência
 UHPLC-MS – Cromatografia Líquida de Ultra-Eficiência acoplada à Espectrometria de Massa
 UHPLC-MS/MS – Cromatografia Líquida de Ultra-Eficiência acoplada à Espectrometria de Massa *Tandem*
 UV – Detetor Ultravioleta

WADA – Agência Mundial Anti-Doping (do inglês *World Anti-Doping Agency*)

α – nível de significância

σ_i^2 – variância de Y

$\sum ER\%$ - Somatório do Erro relativo percentual

Palavras-chave

QuEChERS; Medicamentos; Fígado; GC-MS; Validação

Resumo

A Toxicologia Forense tem como principal objetivo a identificação e quantificação de substâncias tóxicas em amostras biológicas como sangue, urina ou fígado. A amostra mais utilizada quer em situações *post-mortem* quer em situações *in vivo* é o sangue, por ser a que melhor pode estabelecer uma correlação entre as concentrações determinadas e os efeitos tóxicos. Contudo, em certos casos *post-mortem* não estão disponíveis e/ou não é possível recorrer a amostras de sangue sendo utilizadas amostras biológicas alternativas, como o fígado. Este órgão é difícil de analisar devido à sua composição complexa e diversa, mas vantajoso visto ser o local do organismo onde se processa o metabolismo dos xenobióticos e apresentar concentrações 10 a 100 vezes superiores às do sangue.

Para a sua análise é necessária uma preparação prévia (extração e limpeza) da amostra, de modo a obter os analitos de interesse numa forma adequada e concentrada para serem analisados pelos métodos cromatográficos hifenados. As técnicas extrativas mais utilizadas são a LLE e SPE, contudo estas são técnicas morosas e laboriosas.

Assim, o principal objetivo da presente dissertação consistiu em desenvolver um método de extração de amostras de fígado utilizando QuEChERS (acrónimo inglês de *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), um método mais simples, rápido, barato e adequado para amostras sólidas, comparativamente com os habitualmente utilizados nos processos extrativos e posterior confirmação qualitativa e quantitativa por GC-MS, em modo de aquisição SIM. O método foi aplicado à extração de medicamentos (amitriptilina, ciamemazina, citalopram, clomipramina, clozapina, fluoxetina, haloperidol, levomepromazina, mirtazapina, olanzapina, sertralina, tiapride, ticlopidina, tramadol, trazodona e venlafaxina), já que as intoxicações medicamentosas apresentam-se como um problema toxicológico de relevância num contexto forense.

A extração por QuEChERS consistiu em homogeneizar a amostra de fígado (1 g), seguida de uma extração inicial de fase única com acetonitrilo e adicionando um excesso de sais ao sobrenadante obtido e, posteriormente, de uma Extração em Fase Sólida por Dispersão (d-SPE).

Desenvolvido e otimizado o método analítico, procedeu-se então à sua validação. O método analítico revelou-se seletivo, linear dentro da gama de trabalho estudada, preciso, exato, com LOD entre 5 e 100 ng/g e LOQ entre 9 e 180 ng/g, recuperações entre 51,89 e 116,02% (à exceção da sertralina, que foi de 46,35%), robusto, sem fenómenos de arrastamento e sem efeito de matriz relevante, exceto para a olanzapina e para a levomepromazina.

O método, aplicado à análise de duas amostras reais, foi considerado adequado para a extração, confirmação qualitativa e quantitativa de medicamentos em amostras de fígado *post-mortem*.

Esta é uma metodologia analítica inovadora na análise destes medicamentos em amostras biológicas e pretende-se implementá-la no trabalho de rotina do Serviço de Química e Toxicologia Forenses do INMLCF, I.P..

Keywords

QuEChERS; Drugs; Liver; GC-MS; Validation

Abstract

The main goal of forensic toxicology is the identification and quantification of toxic substances in biological samples such as blood, urine or liver. The sample most used both in *post-mortem* or *in vivo* situations is the blood, because it is the best that can establish a correlation between the determined concentrations and toxic effects. However, in a number of *post-mortem* situations this sample is not available and/or is not possible to analyze and therefore alternative samples, such as liver, are often used. This organ is not usually easy to analyze, due to its complex and diverse composition, but is advantageous since is the location of the body where the metabolism of xenobiotics happens and displays concentrations 10 to 100 times higher than the blood.

For its analysis previous sample preparation is necessary (extraction and cleaning), in order to obtain the analytes of interest in a suitable and concentrated form to be analyzed by coupled chromatographic methods. The most used techniques for this purpose are LLE and SPE, however these are time consuming and laborious.

Thus, the main objective of this dissertation was develop an extraction method of liver samples using QuEChERS (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe*), a more simple, fast, cheaper and adequate to solid samples method than the usual used in extractive processes and following identification and quantification by GC-MS in SIM acquisition mode. The method was applied to extraction of drugs (amitriptyline, cyamemazine, citalopram, clomipramine, clozapine, fluoxetine, haloperidol, levomepromazine, mirtazapine, olanzapine, sertraline, tiapride, ticlopidine, tramadol, trazodone and venlafaxine), since drug intoxication presents as a relevant toxicological problem in a forensic context.

The QuEChERS extraction consisted in liver (1 g) homogenization, followed by a single-phase extraction with acetonitrile and adding an excess of salts to the homogenate, and after a dispersive Solid-Phase Extraction (d-SPE).

Developed and optimized the analytical method, it proceeded to its validation. The analytical method proved to be selective, linear over the studied working range, precise, accurate, with LOD between 5 and 100 ng/g, LOQ between 9 and 180 ng/g, recoveries

between 51,89 and 116,02% (except for sertraline, which was 46,35%), robust, without carryover and no relevant matrix effect, except for olanzapine and levomepromazine.

The method, applied to two real samples analysis, was considered suitable for the extraction, identification and quantification of drugs in the *post-mortem* liver samples.

This is an innovative analytical methodology in the analysis of drugs in biological samples and intended to implement it in the routine work of the Serviço de Química e Toxicologia Forenses of INMLCF, IP..

I. Introdução teórica



1. Introdução

Atualmente, após todo o desenvolvimento económico e industrial a nível mundial, existe uma elevada variedade de medicamentos disponível para o tratamento, prevenção e/ou diagnóstico das mais variadas patologias, sendo a sua aquisição extremamente acessível. Apesar do seu intuito inicial ser o de auxiliar o melhoramento das condições de vida dos seres humanos, o aparecimento desta diversidade alargada de medicamentos veio também possibilitar o aparecimento de práticas abusivas e irracionais não relacionadas com a terapêutica pretendida, como a automedicação. Este uso irracional, conjuntamente com a falta de controlo e prevenção, tornou-se assim num problema de relevância a nível mundial e que pode levar a um sério problema de saúde pública, as intoxicações medicamentosas (1,2).

Os medicamentos são considerados, nos dias de hoje, os principais responsáveis pelo aumento do número de intoxicações, quer seja em sentido estrito, derivado de sobredosagens, quer seja por acidentes terapêuticos, devido a sensibilidade específica do sujeito, mesmo com a administração de doses baixas ou por interações com outros medicamentos ou outras substâncias (e.g. álcool e/ou drogas de abuso) (2,3).

Por intoxicação entende-se a exposição de um indivíduo a uma ou mais substâncias que, associadas, têm um elevado potencial para causar dano. Pode ser classificada quanto à sua etiologia como intoxicação acidental, resultante de automedicação, sobredosagem (definida como sendo a “administração de uma quantidade de medicamento, por cada administração ou cumulativa, superior à quantidade máxima recomendada”), erro de medicação (definido como “qualquer erro não intencional que ocorra na prescrição, dispensa ou administração de um medicamento”), administração simultânea de vários medicamentos, entre outros e intoxicação intencional baseada na satisfação da dependência (entenda-se necessidade de repetidas doses de medicamento para se sentir bem psíquica e/ou fisicamente) e tolerância (que consiste na diminuição dos efeitos do medicamento quando administrado numa dose específica, sendo por isso necessário aumentar a dose para se obter o efeito pretendido) a um determinado medicamento, com objetivo de aliviar um elevado grau de dor ou ansiedade. A intoxicação intencional inclui também a autolesão, na forma de suicídio, derivada de administração de doses elevadas de um ou mais medicamentos simultaneamente e/ou da sua associação com outras substâncias (3–5).

Em 2010 das 28 mil chamadas recebidas pelo Centro de Informação Antivenenos (CIAV) do Instituto Nacional de Emergência Médica (INEM), 15 mil foram devido a

I. Introdução teórica

1. Introdução

intoxicações por medicamentos. As principais causas dessas intoxicações medicamentosas deveram-se a automedicação, erros de dosagem, confusão do medicamento, entre outras (2,6).

Um estudo feito pelo Instituto Nacional de Estatística (INE) no ano de 2005 demonstrou que em Portugal 52,3% da população tomou medicamentos receitados por um médico e adquiridos numa farmácia, tendo a sua maior incidência (86,5%) no grupo etário com mais de 75 anos (7). Por isto, Portugal é um dos países com maior consumo de medicamentos *per capita* (8).

Em relação ao tipo de medicamentos mais consumidos em Portugal, segundo a Autoridade Nacional do Medicamento e Produtos de Saúde, I. P. (Infarmed), no ano de 2012 e tendo em conta a distribuição de encargos do Serviço Nacional de Saúde (SNS), o grupo farmacoterapêutico relacionado com o aparelho cardiovascular é o que apresenta uma maior incidência (28,68%) seguido do grupo relacionado com o sistema nervoso central (SNC) (22,34%). Dentro do referido grupo relacionado com o SNC verifica-se que os psicofármacos (inclui os subgrupos terapêuticos antidepressores, antipsicóticos, ansiolíticos, sedativos e hipnóticos e lítio) são os mais utilizados (9). É de referir ainda que o consumo de psicofármacos em Portugal registou um aumento entre os anos de 2000 e 2012, sendo os maiores aumentos verificados no consumo de antidepressores (240%) e antipsicóticos (171%) (10).

Num estudo sobre saúde mental realizado em 2010 pelo *Eurobarometer* mostrou que em Portugal, num total de 1032 entrevistados, o número de pessoas que tinham consumido antidepressores nos últimos 12 meses era superior à média da União Europeia (15% contra apenas 7%) (11).

Relativamente aos antidepressores, no ano de 2000 a fluoxetina era a substância mais consumida no ambulatório do SNS, contudo, nos anos decorrentes até 2012, observou-se um aumento acentuado do consumo de sertralina, substância que, no ano de 2012, era o antidepressor mais utilizado. Quanto aos antipsicóticos, em 2000 predominava o consumo de haloperidol (mais consumido) e de ciamemazina. A partir do início do milénio houve um aumento acentuado do consumo de quetiapina e olanzapina, sendo, em 2012, a quetiapina o antipsicótico mais consumido no nosso país (10).

Daí ser relevante a identificação e quantificação de medicamentos em casos forenses *post-mortem*, de forma a que seja possível identificar casos de intoxicações medicamentosas (3).

I. Introdução teórica

1. Introdução

Neste sentido torna-se indispensável a existência de métodos de análise rápidos e sensíveis, que permitam a análise deste tipo de analitos em amostras biológicas e que sejam passíveis de aplicar no trabalho laboratorial de rotina de um serviço de química e toxicologia forenses, sendo que os resultados analíticos devem ser o mais rigorosos possível, visto serem resultados que têm implicações jurídicas sobre um indivíduo ou sobre a sociedade. Assim, após o desenvolvimento do método analítico é necessário proceder à sua validação, ou seja, em verificar se o método se adequa ao fim a que se destina, neste caso a confirmação qualitativa e quantitativa de medicamentos em amostras de fígado *post-mortem* (12).

Não existem descritas metodologias analíticas aplicadas à análise simultânea dos medicamentos em estudo, especificamente, em amostras de fígado *post-mortem*, apenas se verifica a existência de metodologias aplicadas a outros tipos de amostras biológicas, como sangue, urina ou plasma. Essas metodologias consistem maioritariamente em duas técnicas separativas, a cromatografia gasosa e a cromatografia líquida acopladas à espectrometria de massa (GC-MS e LC-MS, respetivamente) (13,14).

Visto o tipo de amostra ser muito complexo e a sua análise compreender a utilização de métodos cromatográficos e espectrometria de massa, é essencial uma preparação da amostra prévia à análise instrumental. A preparação, é normalmente uma etapa morosa e que pode ser realizada por várias metodologias, tais como a extração em fase sólida (SPE), a extração líquido-líquido (LLE), a micro-extração em fase sólida (SPME) ou a precipitação de proteínas (PP). Outra metodologia, mais recente, que também pode ser aplicada à extração de medicamentos de amostras biológicas e que apresenta as vantagens de ser mais rápida e mais simples em relação às anteriormente enumeradas são os QuEChERS (acrónimo inglês de *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe* e pronunciado como “catchers”) (15,16). Esta metodologia é usualmente aplicada à toxicologia alimentar na análise de pesticidas, contudo tem vindo a ser aplicada à toxicologia forense, ainda que em pequena escala, sendo aplicada a amostras de fígado *post-mortem* por Usui *et al.* (15), para a extração de drogas de abuso e não de medicamentos, sendo, por isso, inovadora a sua aplicação à análise de medicamentos em amostras de fígado *post-mortem*, como desenvolvido neste trabalho.

2. Substâncias Medicamentosas

Medicamento, segundo o Decreto-Lei Nº176/2006 de 30 de Agosto, é designado como sendo “toda a substância ou associação de substâncias apresentada como possuindo propriedades curativas ou preventivas de doenças em seres humanos ou dos seus sintomas ou que possa ser utilizada ou administrada no ser humano com vista a estabelecer um diagnóstico médico ou, exercendo uma ação farmacológica, imunológica ou metabólica, a restaurar, corrigir ou modificar funções fisiológicas” (17).

Os medicamentos são introduzidos no organismo (administração) por via oral, endovenosa, respiratória, subcutânea, entre outras, de modo a que cheguem ao sangue (absorção) e se dirijam para o local onde são requeridos e no qual têm a sua ação (distribuição), sendo posteriormente excretados pelo organismo (eliminação). Antes de serem eliminados estes sofrem normalmente alterações através de processos químicos (metabolismo), sendo o principal local desta metabolização o fígado. Este processo é designado como sendo a farmacocinética do fármaco (18).

Os medicamentos podem ser classificados em diferentes grupos farmacoterapêuticos, de acordo com as suas aplicações terapêuticas (por exemplo SNC, aparelho cardiovascular, entre outros) (19). Neste trabalho foram estudados apenas alguns medicamentos representativos desses grupos. São eles: o tramadol pertencente aos analgésicos estupefacientes, a ticlopidina incluída no grupo dos anticoagulantes e antitrombóticos; a amitriptilina, o citalopram, a clomipramina, a fluoxetina, a mirtazapina, a sertralina, a trazodona e a venlafaxina pertencentes aos antidepressores e a ciamemazina, a clozapina, o haloperidol, a levomepromazina, a olanzapina e o tiapride incluídos no grupo dos antipsicóticos.

Serão descritas de seguida as características mais importantes dos medicamentos em estudo incluindo a sua função, o seu mecanismo de ação, a sua farmacocinética e as principais reações adversas (também designadas como efeitos secundários e que consistem numa “reação nociva e não intencional a um medicamento”) da sua utilização (4). As propriedades físico-químicas e as concentrações estimadas como terapêuticas, tóxicas e letais dos medicamentos em estudo podem ser consultadas na tabela 1 (20–25).

I. Introdução teórica

2. Substâncias Medicamentosas

Tabela 1. Propriedades físico-químicas e concentrações terapêuticas, tóxicas e letais dos medicamentos em estudo.

Medicamento	Fórmula molecular	Peso Molecular (g/mol)	pKa (25°C)	Concentração Terapêutica	Concentração Tóxica	Concentração Letal
Amitriptilina	C ₂₀ H ₂₃ N	277,4	9,40	0,05 – 0,2 mg/L (em sangue)	>0,3 mg/L (em plasma)	2 mg/L (em sangue)
Ciamemazina	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ S	323,5	9,31	0,5 mg/L (em plasma)	-	9,8 mg/L (em sangue)
Citalopram	C ₂₀ H ₂₁ FN ₂ O	324,4	9,50	0,01-0,2 mg/L (em plasma)	0,4 mg/L (em plasma)	0,5-0,8 mg/L (em plasma)
Clomipramina	C ₁₉ H ₂₃ ClN ₂	314,9	9,50	<0,2 mg/L (em plasma)	>0,4 mg/L (em plasma)	>1 mg/L (em plasma)
Clozapina	C ₁₈ H ₁₉ ClN ₄	326,8	pKa ₁ : 3,70 pKa ₂ : 7,60	<0,5 mg/L (em plasma)	0,6 mg/L (em plasma)	3 mg/L (em plasma)
Fluoxetina	C ₁₇ H ₁₈ F ₃ NO	309,3	9,50	0,1-0,5 mg/L (em plasma)	1 mg/L (em plasma)	2 mg/L (em plasma)
Haloperidol	C ₂₁ H ₂₃ ClFNO ₂	375,9	8,30	<0,04 mg/L (em plasma)	0,05 mg/L (em plasma)	0,5 mg/L (em plasma)
Levomepromazina	C ₁₉ H ₂₄ N ₂ OS	328,5	9,20	<0,15 mg/L (em plasma)	0,4 mg/L (em plasma)	0,4 mg/L (em plasma)
Mirtazapina	C ₁₇ H ₁₉ N ₃	265,4	7,10	0,02-0,1 mg/L (em plasma)	>1 mg/L (em plasma)	-
Olanzapina	C ₁₇ H ₂₀ N ₄ S	312,4	pKa ₁ : 5,00 pKa ₂ : 7,40	<0,02 mg/L (em plasma)	0,1-0,2 mg/L (em plasma)	>0,2 mg/L (em sangue)
Sertralina	C ₁₇ H ₁₇ Cl ₂ N	306,2	8,50	0,05-0,25 mg/L (em plasma)	0,3 mg/L (em plasma)	0,4 mg/L (em sangue)
Tiapride	C ₁₅ H ₂₄ N ₂ O ₄ S	328,4	9,08	1-2 mg/L (em plasma)	-	-
Ticlopidina	C ₁₄ H ₁₄ ClNS	263,8	7,6	1-2 mg/L (em plasma)	-	1600 mg/kg (em ratos)
Tramadol	C ₁₆ H ₂₅ NO ₂	263,4	pKa ₁ : 8,30 pKa ₂ : 9,41	0,1-0,8 mg/L (em sangue)	1,0 mg/L (em sangue)	2,0 mg/L (em sangue)
Trazodona	C ₁₉ H ₂₂ ClN ₅ O	371,9	pKa ₁ : 6,10 pKa ₂ : 11,10	0,3-1,5 mg/L (em plasma)	2-4 mg/L (em plasma)	15 mg/L (em plasma)
Venlafaxina	C ₁₇ H ₂₇ NO ₂	277,4	9,40	0,04-0,15 mg/L (em plasma)	6 mg/L (em sangue)	45 mg/L (em sangue)

2.1 Analgésicos estupefacientes

Os opiáceos e opióides, apesar de apresentarem efeitos farmacológicos semelhantes, são substâncias com origens e estruturas químicas diferentes. Os primeiros são derivados do ópio (papoila *Papaver Somniferum*), enquanto que os últimos são substâncias sintetizadas quimicamente. Todos eles têm em comum o facto de atuarem nos recetores opióides do SNC. Desta forma, a morfina, a codeína e a hidroxicodeína são exemplos de opiáceos, enquanto que o tramadol, o fentanil e a metadona são exemplos de opióides. (26,27)

Os analgésicos estupefacientes, opiáceos ou opióides, têm um duplo papel na sociedade, visto que são associados a situações de abuso e de dependência, mas também são considerados medicamentos fundamentais no tratamento da dor, por exemplo. Utilizados desde 3400 a.C., os opiáceos no século XIX levantaram grandes questões quanto à sua importância no desenvolvimento de padrões de abuso e de dependência. Por isso, no início do século passado e com a síntese dos opióides verificaram-se tentativas de controlar e regulamentar a sua distribuição e uso, reconhecendo-se contudo a importância da utilização destes como medicamentos para o tratamento da dor aguda ou crónica (28).

Deste modo, os analgésicos estupefacientes são utilizados no tratamento da dor aguda e crónica, têm a sua ação farmacológica sobre o SNC e são agonistas, agonistas-antagonistas mistos ou agonistas parciais de acordo com a sua ação nos recetores opióides. Os recetores opióides incluem o recetor μ (miu), κ (kappa) e δ (delta). Os efeitos da ação sobre esses recetores são apresentados na tabela 2 (19).

Tabela 2. Efeitos correspondentes à atuação sobre os recetores opióides.

Recetor Opióide	Efeitos
miu (μ)	Analgesia supraespinal e espinal;
	Sedação;
	Depressão respiratória;
	Inibição da motilidade intestinal;
	Modulação da libertação de vários neurotransmissores e hormonas.
kappa (κ)	Analgesia supraespinal e espinal;
	Inibição da motilidade intestinal e
	Efeitos psicomiméticos (ex. alucinações)
delta (δ)	Analgesia supraespinal e espinal;
	Modulação da libertação de vários neurotransmissores e hormonas.

Neste trabalho apenas é estudado o tramadol.

2.1.1 Tramadol

O tramadol (figura 1) é um analgésico estupefaciente sintético, com indicação terapêutica para o tratamento de dor moderada a intensa. Deve a sua capacidade analgésica a um duplo mecanismo de ação: por ser um agonista puro não seletivo dos recetores μ , κ e δ , com elevada afinidade para os recetores μ e por ter a capacidade de inibição da recaptação de noradrenalina e, ainda, por potenciar a transmissão serotoninérgica, estimulando a libertação de serotonina pré-sináptica (19,29–31).

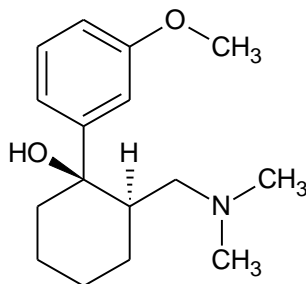


Figura 1. Estrutura química do tramadol.

Em termos farmacocinéticos, quando administrado por via oral ou parentérica o tramadol é rapidamente absorvido (90%), sendo que a sua absorção não é afetada pela presença de alimentos no organismo. Verifica-se um ligeiro metabolismo de primeira passagem (30%), ou seja, estes são metabolizados primeiramente pelo fígado antes de atingirem a circulação sistémica, ao nível do sistema enzimático do citocromo P450. A ligação a proteínas plasmáticas não é muito significativa, cerca de 20%. A sua metabolização, por um enzima do citocromo P450, a CYP2D6, consiste em reações de N- e O-desmetilação e conjugação com ácido glucurónico e sulfato, formando maioritariamente O-desmetil tramadol, N,O-didesmetil tramadol e N-monodesmetil tramadol. O O-desmetil tramadol é o único metabolito farmacologicamente ativo e apresenta uma atividade analgésica superior à do tramadol. A excreção é feita quase totalmente pela urina (90%) até três dias após o consumo, enquanto que o restante é eliminado pelas fezes. O tramadol atravessa a barreira hematoencefálica e a placenta e pode ser detetado no leite materno. O perfil farmacocinético deste medicamento, em doses terapêuticas, é linear, ou seja, a velocidade de eliminação é proporcional à concentração de tramadol presente no organismo (20,29,32,33).

Devido a interações com outros medicamentos, o tramadol não deve ser administrado conjuntamente com medicamentos serotoninérgicos, como os antidepressores inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS), inibidores da monoamina oxidase

I. Introdução teórica

2. *Substâncias Medicamentosas*

(IMAO) e tricíclicos (TCA), já que pode provocar um síndrome serotoninérgico, desencadeador de manifestações como tremor, hiperreflexia ou hipertonia (29).

As reações adversas do tramadol são as indicadas para os analgésicos estupefacientes em geral, que incluem alucinações, confusão, ansiedade, vômitos, tremores, entre outros. Em casos de sobredosagem verificam-se os seguintes sintomas: miose, vômitos, colapso cardiovascular, alteração de consciência e coma, convulsões, depressão respiratória e paragem respiratória. O tramadol tem um leve potencial de dependência e, em alguns casos, o indivíduo pode desenvolver tolerância ao medicamento (29).

2.2 Anticoagulantes e antitrombóticos

As trombozes venosas são muito frequentes, com elevados graus de incidência na população em geral e provocam sérios problemas de saúde como ataques cardíacos e acidentes vasculares cerebrais, sendo uma das principais causas de morte e incapacidades no mundo desenvolvido. A sua prevenção e tratamento é feito com recurso a antitrombóticos, que incluem os anticoagulantes e os antiagregantes plaquetários. Contudo, foi apenas no início do século XX que o primeiro anticoagulante efetivo no tratamento dessas trombozes venosas foi desenvolvido, a heparina, seguido da varfarina. A aspirina foi o primeiro antiagregante plaquetário descoberto (34,35).

Este tipo de medicamentos, como o próprio nome indica, interfere com a coagulação sanguínea, diminuindo-a. Os anticoagulantes, como a varfarina, não modificam relevantemente a função das plaquetas, atuando na redução da formação de fibrina, uma proteína importante na formação dos trombos venosos. Sendo assim, os anticoagulantes são indicados para situações de tromboembolismo venoso. Os antiagregantes plaquetários, por sua vez, têm ação na agregação das plaquetas, opondo-se à ativação plaquetária necessária à formação do rolhão hemostático, ou seja, reduzem a agregação de plaquetas impedindo a formação de trombos na sequência de disfunções do endotélio. Os principais exemplos de antiagregantes plaquetários são o ácido acetilsalicílico, o clopidogrel e a ticlopidina, que são largamente utilizados na prevenção de acidentes trombóticos vasculares em doentes que sofreram enfarte agudo do miocárdio, acidente vascular cerebral isquémico ou angina (19,35–38).

Neste trabalho apenas será estudada a ticlopidina.

2.2.1 Ticlopidina

A ticlopidina (figura 2) é um inibidor da agregação plaquetária, provocando uma ação dependente da dose sobre a agregação das plaquetas, prolongando o tempo de hemorragia. O mecanismo de ação da ticlopidina consiste na inibição, Adenosina Difosfato (ADP)-dependente, da ligação do fibrinogénio à membrana da plaqueta, impedindo a agregação plaquetária. É utilizada na prevenção de trombozes em doentes de acidente vascular cerebral e doenças coronárias (22,39).

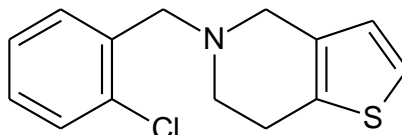


Figura 2. Estrutura química da ticlopidina.

Farmacocineticamente, após administração oral a ticlopidina é rapidamente e quase totalmente absorvida, sendo que a sua biodisponibilidade (velocidade e grau com que a substância é absorvida e se torna disponível no local de ação) aumenta na presença de alimentos. É metabolizada rapidamente e extensivamente no fígado por reações de N-desalquilação e oxidação. Liga-se em grande extensão a proteínas plasmáticas (98%). Cerca de 60% da dose administrada é excretada pela urina na forma de metabolito e 25% é excretado pelas fezes. Cerca de 1% é ainda excretado na forma não alterada. O perfil farmacocinético da ticlopidina não é linear (20,22,39–41).

O consumo de ticlopidina não deve ser realizado em conjunto com outros tipos de medicamentos, como os anti-inflamatórios não esteróides, anticoagulantes orais, heparinas, outros antiagregantes plaquetários e salicilatos, devido a possíveis interações, responsáveis pelo aumento de risco hemorrágico. Para associações de ticlopidina com digoxina, fenobarbital, fenitoína ou teofilina é também necessário precaução de utilização, devido às possíveis interações e, consequentes, efeitos indesejáveis (39).

Os efeitos secundários mais frequentes da administração de ticlopidina são: agranulocitose, diarreia, náuseas, prurido, erupções cutâneas, aumento de enzimas hepáticas, entre outras. Em caso de sobredosagem existe o risco de hemorragia (39).

2.3 Antidepressores

Como já descrito anteriormente o consumo de antidepressores em Portugal tem sofrido um aumento considerável, sendo atualmente o segundo grupo farmacoterapêutico mais consumido. Estes dados são conducentes com a crescente preocupação relativa ao

I. Introdução teórica

2. Substâncias Medicamentosas

aumento do número de casos de depressão, considerado atualmente como um problema de saúde pública, e corroborado pelo estudo do *Eurobarometer* em 2010, que mostrou que em Portugal 15% da população consumiu antidepressores nos últimos 12 meses para tratamento, maioritariamente, da depressão (55%) e da ansiedade (41%) (10,11).

A descoberta nos anos 50 do século passado de medicamentos antidepressores e a sua consequente aplicação na prática clínica no tratamento de transtornos depressivos, possibilitou o estudo e o entendimento dos mecanismos subjacentes a esses transtornos. Os primeiros antidepressores sintetizados foram a iproniazida, um inibidor da monoamina oxidase (IMAO) e a imipramina, um antidepressor tricíclico (TCA). Seguiu-se a síntese de novos antidepressores pertencentes a estas classes (IMAO e TCA), contudo, e apesar de serem extremamente eficazes, estes antidepressores apresentavam efeitos secundários consideráveis, podendo mesmo ser letais, devido à sua inespecífica ação farmacológica. Até que nos anos 80 surgiram novas classes de antidepressores: os antidepressores inibidores seletivos da recaptação da serotonina (ISRS), os antidepressores inibidores da monoamina oxidase do tipo A (IMAO, A), os antidepressores inibidores da recaptação da serotonina e da noradrenalina (ISRSN) e os antidepressores inibidores seletivos da recaptação de serotonina / antagonistas dos recetores 2A de serotonina (SARI), que apresentam um perfil farmacocinético mais favorável, são mais seguros e melhor tolerados pelos indivíduos e são classificados de acordo com a sua função farmacológica e não com a sua estrutura química, como os anteriores. Em termos gerais pode-se concluir que os antidepressores são mais distinguíveis pelo seu perfil de reações adversas e pelas suas propriedades farmacocinéticas do que propriamente pelo seu padrão de eficácia terapêutica (19,42–44).

Os medicamentos antidepressores têm mostrado eficácia no controlo sintomático de perturbações depressivas do humor, seja depressão major, seja alterações distímicas (19).

Em relação ao mecanismo de ação, estes medicamentos, de um modo geral, interferem com a recaptação, aumentando a disponibilidade sináptica, de um ou mais neurotransmissores, principalmente serotonina e noradrenalina, através da ação em diversos recetores sinápticos e enzimas específicos. É essa ação nesses recetores que leva a modificações adaptativas dos mesmos, diminuindo o número e a sensibilidade (*down-regulation*) dos recetores pós-sinápticos, que estavam aumentados durante a depressão, devido ao défice desses neurotransmissores e que, por sua vez, explica o processo de cura (19,30,42).

I. Introdução teórica

2. Substâncias Medicamentosas

Os antidepressores apresentam um potencial de dependência e de habituação quase nulos e os seus efeitos só são observados entre duas a três semanas após a administração, devido às alterações dos recetores referidos anteriormente (30).

De seguida será feita uma abordagem mais detalhada dos medicamentos em estudo pertencentes às classes de antidepressores mencionadas.

2.3.1 Antidepressores tricíclicos e afins (TCA)

Os TCA, assim designados devido à sua estrutura química com três anéis (figura 3) podem ser classificados de acordo com a natureza do ciclo central: ciclo sem heteroátomos, como a amitriptilina; ciclo com um heteroátomo, que pode ser azoto, como por exemplo na clomipramina, ou que pode ser oxigénio ou enxofre, como a doxepina e a dosulepina, respetivamente ou ciclo com mais que um heteroátomo, como a tianeptina (19,45).

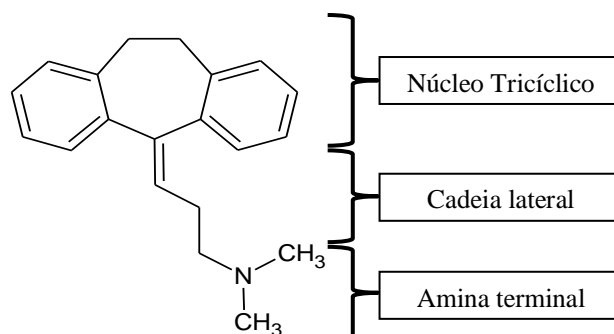


Figura 3. Estrutura química geral dos TCA, representada pela amitriptilina.

O seu mecanismo de ação consiste na inibição, de forma não seletiva, da recaptação de serotonina, noradrenalina e dopamina, esta última em menor proporção, num nível pré-sináptico. A amina terminal pode ser secundária ou terciária, inibindo preferencialmente a recaptação de noradrenalina ou de serotonina, respetivamente. Os TCA antagonizam os recetores muscarínicos colinérgicos, histamínicos de tipo 1, α_2 e β -adrenérgicos, serotoninérgicos e, raramente, os dopaminérgicos a um nível pós-sináptico, responsável pelos seus efeitos indesejáveis (19,42). O efeito do TCA só é manifestado após alguns dias do início do consumo e é atingido em pleno após 2 a 3 semanas (46).

Existem ainda nesta classe os antidepressores tetracíclicos e afins, como é o caso da maprotilina, que é um inibidor seletivo da recaptação de monoaminas, mas que partilha com os TCA algumas propriedades terapêuticas, apesar de ser estruturalmente diferente destes, e que, por isso, seja englobada nesta classe de antidepressores (19,47).

Quanto à sua farmacocinética, os TCA são bem absorvidos pelo trato gastrointestinal (TGI). Em termos de metabolismo, são metabolizados em cerca de 55 a

I. Introdução teórica

2. Substâncias Medicamentosas

80% pelo metabolismo de primeira passagem. São bastante lipofílicos, acumulando-se maioritariamente no miocárdio e em tecidos cerebrais, o que possibilita que atravessem a barreira placentária e passem para o leite materno. Ligam-se fortemente a proteínas plasmáticas, apresentando, por isso, uma baixa biodisponibilidade. A sua eliminação é feita através do metabolismo hepático pelos enzimas do citocromo P450, por N-desmetilação, hidroxilação ou conjugação. A amitriptilina, por exemplo, é desmetilada dando origem a um metabolito ativo, a nortriptilina. A excreção é variável para cada um dos TCA, por exemplo a amitriptilina é eliminada entre 10 a 46 horas após a administração. É de referir ainda que a farmacocinética varia com o sexo do indivíduo (24,42).

Interações medicamentosas entre os TCA e outros medicamentos são comuns e de significativa importância. Podem apresentar interações com medicamentos simpaticomiméticos, hormonas tiroideias, antiarrítmicos, depressores do SNC (e.g. álcool e barbitúricos), IMAO, medicamentos metabolizados pelos enzimas do citocromo P450, entre outros, podendo ainda verificar-se efeitos aditivos nas reações adversas dos TCA quando conjugados com medicamentos como anti-histamínicos, anticolinérgicos ou fenotiazinas (19,46,48,49).

As reações adversas comuns aos TCA são a sedação, efeitos anticolinérgicos (e.g. retenção urinária, quadros confusionais, aumento da pressão intraocular, mucosas secas, obstipação), hipotensão ortostática, alterações do ritmo cardíaco e agravamento de diabetes pré-existente, entre outros (19,46,48,49).

A sobredosagem com estes antidepressores pode ser fatal e é caracterizada por agitação, convulsões, sonolência grave, alteração da frequência cardíaca, depressão do SNC, entre outros. Pode ainda levar a coma, que consequentemente progride para uma depressão respiratória, originando a morte (42,46,48,49).

Os medicamentos em estudo pertencentes a esta classe são: amitriptilina, clomipramina e mirtazapina, representados na figura 4.

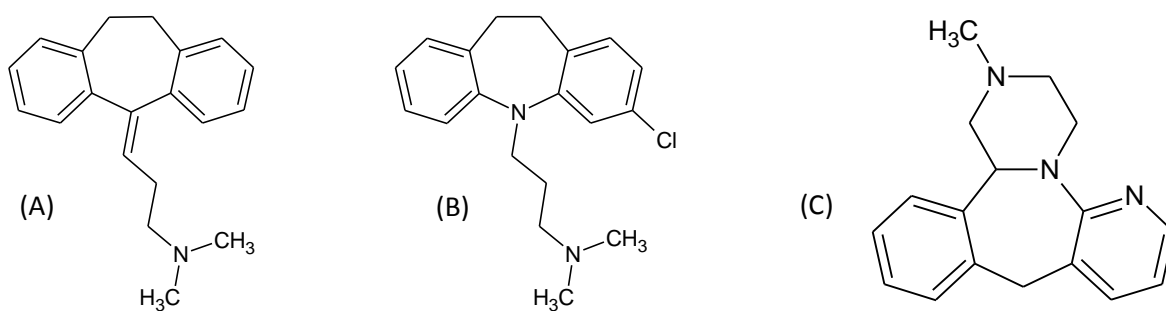


Figura 4. Estruturas químicas dos TCA em estudo: (A) amitriptilina; (B) clomipramina; (C) mirtazapina.

2.3.2 Antidepressores inibidores seletivos da recaptação de serotonina (ISRS)

Os ISRS surgiram devido à necessidade de existirem alternativas, mais seguras e melhor toleradas pelos indivíduos, aos TCA, mas que apresentassem a mesma eficácia. Deste modo, os seus efeitos farmacológicos são muito próximos dos efeitos dos TCA, apesar de estruturalmente muito diferentes, mas desprovidos de efeitos secundários, como cardiotoxicidade e toxicidade para o SNC, razões pelas quais passaram em muitos países a serem a primeira escolha em termos de antidepressores utilizados. O primeiro ISRS, comercializado no Reino Unido, em 1983, foi a fluvoxamina, seguido da fluoxetina (42,50). Estes medicamentos são indicados para o tratamento da depressão, tal como todos os antidepressores, mas são também indicados para o tratamento da ansiedade generalizada, de transtornos obsessivo-compulsivos e de alterações do comportamento alimentar (19,50,51).

O citalopram, a fluoxetina e a sertralina são os ISRS em estudo (figura 5).

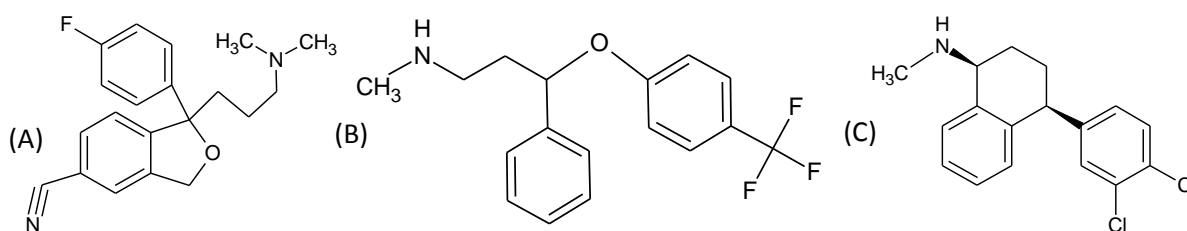


Figura 5. Estruturas químicas dos ISRS em estudo: (A) citalopram; (B) fluoxetina; (C) sertralina.

Relativamente ao seu mecanismo de ação, os ISRS apresentam uma elevada afinidade para os locais de recaptação da serotonina e, pelo contrário, baixa para os locais de recaptação de noradrenalina, inibindo assim de forma potente e seletiva a recaptação da serotonina e potencializando a neurotransmissão serotoninérgica (42,51,52).

Cada ISRS, apesar de terem todos o mesmo mecanismo de ação, apresenta uma farmacocinética diferente. São facilmente e rapidamente absorvidos pelo TGI após administração oral e ligam-se fortemente a proteínas plasmáticas. Em termos de metabolismo, são metabolizados pelo fígado, pelos enzimas do citocromo P-450 e são excretados através da urina, maioritariamente na forma de metabolitos conjugados inativos (42).

A biodisponibilidade da fluoxetina é inferior a 90%, devido ao metabolismo de primeira passagem. O seu perfil farmacocinético não é linear. A fluoxetina é intensamente

I. Introdução teórica

2. Substâncias Medicamentosas

metabolizada (N-desmetilação), maioritariamente pelo enzima CYP2D6, dando origem ao metabolito ativo, a norfluoxetina, e a outros metabolitos. Após administração oral é excretada (<10%) pela urina sob a forma de glucuronido ou na forma não metabolizada (42,50,51,53).

Em relação à sertralina, a sua principal via de eliminação é o metabolismo hepático de primeira passagem, sendo que apenas 0,2% do que é administrado oralmente é excretado na forma não metabolizada pela urina. O metabolismo é feito por reações de N-desmetilação, através do enzima CYP3A4, dando origem à desmetilsertralina, sendo que esta apresenta um maior tempo de semi-vida ($t_{1/2}$) do que a sertralina, contudo este metabolito apresenta apenas 5 a 10% da capacidade da sertralina como inibidor da recaptação da serotonina. Cerca de 50% da sertralina administrada oralmente é excretada pelas fezes, ao contrário da maioria dos ISRS. Este medicamento apresenta um perfil farmacocinético linear e é extremamente afetada pela redistribuição *post-mortem* (42,50,51,54,55).

O citalopram, ao contrário dos outros ISRS referidos, não é muito afetado pelo metabolismo de primeira passagem, apresentando uma biodisponibilidade de cerca de 80%. A sua principal reação de metabolização, essencialmente pelo enzima CYP2C19, é a N-desmetilação formando desmetilcitalopram, que é consequentemente N-desmetilado a didesmetilcitalopram. Para além destes, formam-se ainda outros metabolitos, mas apenas os referidos são biologicamente ativos e detetados no sangue em quantidades assinaláveis. Há que referir ainda que a farmacocinética da citalopram é linear (42,50,51,56).

As reações adversas resultantes do consumo de ISRS são, normalmente, náuseas, vômitos, dor abdominal, diarreia, obstipação, anorexia, perda de peso, urticária, fotossensibilidade, insónias, tremores, entre outras (19).

Em casos de sobredosagem pode ocorrer o síndrome serotoninérgico, que pode ser fatal. Os sintomas apresentados são diarreia, inquietação, agitação extrema, convulsões, hipertermia, coma, estado epilético, colapso cardiovascular, entre outros. A ocorrência do síndrome serotoninérgico pode ainda derivar de interações dos ISRS com outros medicamentos que afetam a transmissão serotoninérgica, como TCA ou IMAO, ou medicamentos que inibam a ação dos enzimas do citocromo P450 (42,53,54,56,57).

2.3.3 Antidepressores inibidores seletivos da recaptação de serotonina e de noradrenalina (ISRSN)

Os ISRS apesar de terem surgido da necessidade de encontrar uma alternativa, melhor tolerada, aos TCA, continuavam a apresentar efeitos secundários indesejados, ainda que em muito menor escala que os TCA, que com a descoberta do eventual papel da noradrenalina na doença depressiva poderiam ser colmatados. Assim, com a ideia inicial de combinar a especificidade dos inibidores da recaptação da noradrenalina com os inibidores de recaptação da serotonina, de forma a aumentar a eficácia dos antidepressores em relação à atuação isolada dos mesmos, surge um novo grupo de antidepressores, os ISRSN. Estes podem ser claramente distinguidos dos TCA pela sua melhor tolerabilidade e dos ISRS pela sua melhorada eficácia no tratamento da doença depressiva, visto que não atuam apenas nos níveis de um único neurotransmissor (58).

Os medicamentos pertencentes a esta classe são a venlafaxina, o milnaciprano e a duloxetina (58). Apenas a venlafaxina foi estudada neste trabalho (figura 6).

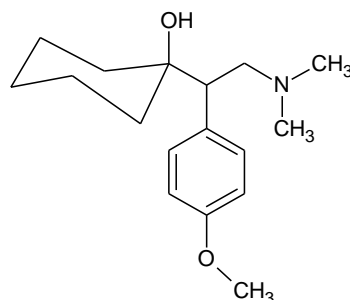


Figura 6. Estrutura química da venlafaxina.

Todos os ISRSN inibem a recaptação de serotonina e de noradrenalina, sem que se verifique a interação com os recetores pós-sinápticos, responsáveis pelos efeitos secundários dos TCA, contudo não o fazem todos com a mesma afinidade e seletividade. A venlafaxina, por exemplo, apresenta uma maior afinidade (30 vezes superior) para a inibição da recaptação de serotonina quando comparada com a afinidade para a inibição da recaptação de noradrenalina. A eficácia da venlafaxina, ao contrário dos ISRS, é dependente da dose (58).

Em termos farmacocinéticos, a venlafaxina é rapidamente e extensamente absorvida (92%), sendo que a ingestão de alimentos atrasa a sua absorção. Apresenta uma biodisponibilidade de 45% e liga-se moderadamente a proteínas plasmáticas. A venlafaxina é metabolizada hepaticamente, com importante metabolismo de primeira passagem, dando origem a O-desmetilvenlafaxina (metabolito ativo, com atividade antidepressiva semelhante à venlafaxina), formado por O-desmetilação pelo enzima

I. Introdução teórica

2. Substâncias Medicamentosas

CYP2D6 e a outros metabolitos, como a N-desmetilvenlafaxina e a N-O-didesmetilvenlafaxina. Cerca de 87% da dose administrada oralmente é excretada pela urina num espaço temporal de 48 horas, sendo 5% na forma não alterada, 29 a 48% na forma de O-desmetilvenlafaxina e o restante noutros metabolitos da venlafaxina (24,42,59–61).

A venlafaxina não deve ser administrada em associação com outros medicamentos, como IMAO, agentes serotoninérgicos (e.g. ISRS), medicamentos ativos no SNC, lítio, diazepam, imipramina, haloperidol, entre outros, devido a possíveis interações entre eles (19,61).

Os principais efeitos secundários apresentados pela administração de venlafaxina são: náuseas, cefaleias, insónias, tonturas, sonolência, pode ainda surgir hipertensão, tremores, suores, entre outros (19,42,60,61). Em casos de sobredosagem de venlafaxina, muitas vezes associada com álcool e outros medicamentos, verificam-se sintomas como taquicardia, sonolência, midríase, convulsões, vômitos, hipotensão, vertigens, alterações eletrocardiográficas, coma e morte (61).

2.3.4 Antidepressores inibidores seletivos da recaptação de serotonina / antagonistas dos recetores 2A de serotonina (SARI)

Nesta classe de antidepressores o medicamento em estudo é a trazodona (figura 7). Este medicamento, derivado da triazolopiridina, é um antidepressor heterocíclico atípico, isto é, possui propriedades farmacológicas e bioquímicas muito específicas, mas pouco compreendidas. Mostra eficácia antidepressiva e efeito ansiolítico, sendo por isso, um dos antidepressores mais prescritos atualmente. É considerada um inibidor da recaptação de serotonina e um antagonista dos recetores 2A de serotonina (5-HT_{2A}), responsável pelo seu efeito antidepressivo e ansiolítico mencionado (52,62).

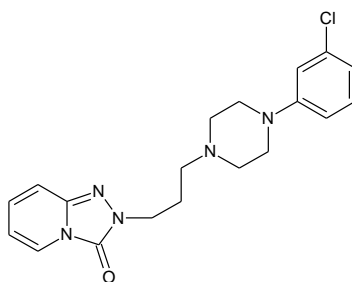


Figura 7. Estrutura química da trazodona.

Quanto à sua farmacocinética, a trazodona é bem absorvida pelo TGI, sendo que a quantidade absorvida é aumentada quando administrada às refeições ou imediatamente

I. Introdução teórica

2. *Substâncias Medicamentosas*

após as mesmas. No entanto, verifica-se uma redução na concentração máxima e um aumento do tempo necessário para atingir o pico plasmático. É muito lipofílica e liga-se fortemente a proteínas plasmáticas (85 a 95%). Sofre metabolismo hepático, através de reações de N-desalquilação, originando a 1,3-clorofenilpiperazina (mCPP), um metabolito ativo, pelo enzima CYP3A4 do citocromo P450. Reações de oxidação e hidroxilação também fazem parte do metabolismo deste medicamento. A excreção é maioritariamente renal (75%), seguida de excreção biliar e fecal. O seu perfil farmacocinético é linear (37,42,62).

Quanto às interações medicamentosas da trazodona, estas são semelhantes às já descritas para os TCA, essencialmente depressores do SNC, IMAO, álcool, antipsicóticos, ansiolíticos, anticonvulsionantes, anticolinérgicos, varfarina, entre outros (19,37,42,62).

A administração da trazodona apresenta usualmente como efeitos secundários: sedação, hipotensão ortostática, tonturas, cefaleia, náuseas e boca seca. Podem ocorrer também reações alérgicas e irritação gástrica, entre outros. Em casos de sobredosagem são observados os seguintes sintomas: sonolência, vertigens, vômitos, taquicardia, cefaleias e coma (37,42).

2.4 Antipsicóticos

Nos anos 50 do século passado foi descoberto o potencial neuroléptico da clorpromazina, o que provocou um grande impacto no tratamento da psicose (definida como a incapacidade que interfere marcadamente com a realização das necessidades quotidianas através de uma perda da noção de realidade ou dos limites próprios do indivíduo), motivando a procura de novos medicamentos com capacidades idênticas e desenvolvendo os, atualmente denominados, antipsicóticos. Até aos anos 80 antipsicóticos semelhantes à clorpromazina (como por exemplo a clozapina) foram desenvolvidos, sendo chamados de antipsicóticos de primeira geração. Estes apresentavam um elevado número de efeitos adversos, com sintomas extrapiramidais significativos. A partir dos anos 80 surgiram então os antipsicóticos de segunda geração, que incluem, por exemplo, o amisulpride, a olanzapina e a risperidona, com o objetivo de substituir os antigos antipsicóticos, diminuindo os seus efeitos adversos, aumentando a sua tolerabilidade e mantendo a sua eficácia. É de referir que a clozapina, mesmo sendo inicialmente um antipsicótico de primeira geração, continuou a ser utilizado após o desenvolvimento dos de segunda geração para o tratamento de esquizofrenia em doentes que não respondiam ao

I. Introdução teórica

2. *Substâncias Medicamentosas*

tratamento com outros antipsicóticos, sendo por isso considerado um antipsicótico de segunda geração (63,64).

Designados inicialmente por neurolépticos devido a apresentarem ações adversas na motricidade e postura dos indivíduos, os antipsicóticos devem assim ser designados tendo em conta os seus critérios terapêuticos e porque alguns deles quase não apresentam efeitos extrapiramidais (30).

Os antipsicóticos têm a sua ação principal no tratamento da esquizofrenia, sendo utilizados no tratamento de psicoses tão díspares como: mania, demência e alterações de comportamento associado a atraso mental, possuindo outros efeitos farmacológicos que podem ser utilizados com vantagens terapêuticas como antieméticos, antivertiginosos e ansiolíticos, desde que em situações bem definidas, sendo necessário avaliar a relação risco-benefício de cada uma dessas potenciais indicações terapêuticas (19,30).

Nas psicoses verificam-se dois tipos de sintomas, os positivos e os negativos. Os primeiros, como alucinações e/ou delírios, são caracterizados pelo excesso de dopamina na via mesolímbica do cérebro, enquanto que os sintomas negativos (alogia, apatia, entre outros) são caracterizados por uma deficiência de dopamina na via mesocortical. Os antipsicóticos foram desenvolvidos tendo em conta as vias dopaminérgicas responsáveis por estes sintomas e todos eles apresentam antagonismo para com os recetores de dopamina, D₂, sendo este antagonismo o responsável pelo efeito antipsicótico (64,65).

A potência e a especificidade do bloqueio dos recetores D₂ e os efeitos noutros recetores sinápticos caracterizam os diferentes antipsicóticos. Estes podem ser classificados de acordo com a sua estrutura química em: antipsicóticos típicos, tricíclicos, convencionais ou de primeira geração, subdivididos em fenotiazinas (e.g. levomepromazina) e butirofenonas (e.g. haloperidol), e antipsicóticos atípicos, heterocíclicos ou de segunda geração (e.g. ciamemazina) (64,65).

Os primeiros, os antipsicóticos típicos, bloqueiam os recetores D₂ com maior ou menor grau de potência: baixa potência, como a clorpromazina, que também afeta significativamente os recetores muscarínicos, histamínicos, colinérgicos e α -1 e os de elevada potência, como o haloperidol, que provocam naturalmente um maior número de efeitos secundários quando se ligam aos recetores comparativamente com os de baixa potência. Os antipsicóticos típicos atuam nos recetores pós-sinápticos na via mesolímbica, melhorando os sintomas positivos, contudo são ineficazes ou pouco eficazes nos sintomas negativos. Por outro lado, atuam também nos recetores das vias nigro-estriatal,

I. Introdução teórica

2. Substâncias Medicamentosas

mesocortical e tuberoinfundibular, provocando efeitos secundários, essencialmente sintomas extrapiramidais (64).

Os antipsicóticos atípicos foram desenvolvidos de forma a suplantar as desvantagens dos anteriores e possuem propriedades químicas e farmacológicas diferentes das dos seus antecessores. Estes, para além do seu antagonismo nos recetores D_2 , são também antagonistas dos recetores de $5-HT_{2A}$. Deste modo, estes antipsicóticos reduzem o risco de sintomas extrapiramidais e melhoram os sintomas negativos quando comparados com os antipsicóticos típicos, visto que a serotonina impede a libertação de dopamina nas vias nigro-estriatal e tuberoinfundibular, mas não na mesolímbica (64,65).

Os fármacos em estudo pertencentes a esta classe (figura 8) são: o haloperidol e a levomepromazina, classificados como antipsicóticos típicos, e a ciamemazina, a clozapina, a olanzapina e o tiapride que são antipsicóticos atípicos (20,30,66).

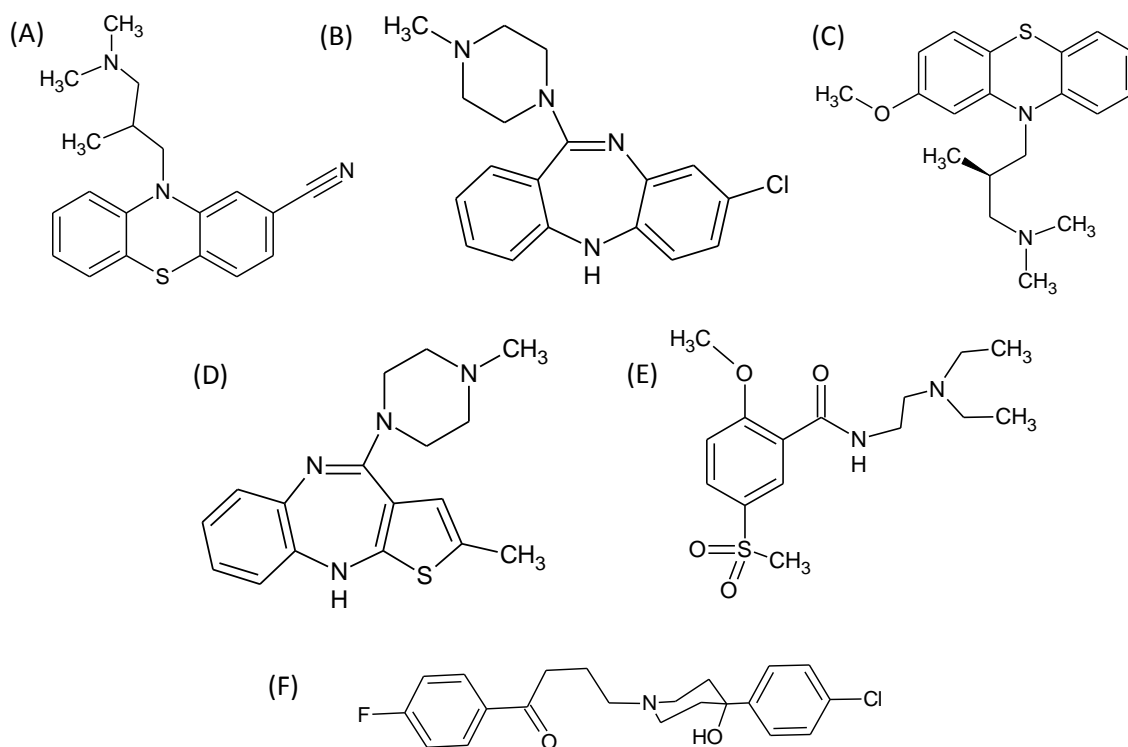


Figura 8. Estruturas químicas dos antipsicóticos em estudo: (A) ciamemazina; (B) clozapina; (C) Levomepromazina; (D) Olanzapina; (E) Tiapride; (F) haloperidol.

O haloperidol é a butirofenona mais utilizada na supressão da sintomatologia psicótica, sendo indicada para o tratamento da esquizofrenia e de outras psicoses, e apresenta um perfil farmacológico mais puro, com elevada potência antagonista sobre recetores da dopamina (30). A levomepromazina é indicada para o tratamento sintomático das psicoses, principalmente para a redução da atividade psicomotora e ainda na

I. Introdução teórica

2. *Substâncias Medicamentosas*

terapêutica da dor crônica, quer de forma isolada, quer associada a analgésicos (67). A clozapina, considerada como o primeiro antipsicótico atípico, é indicada para o tratamento da esquizofrenia resistente a outros antipsicóticos, sendo, por isso, um dos medicamentos mais efetivos no tratamento da esquizofrenia. Apresenta reduzida incidência de efeitos extrapiramidais, bem como, reduzida ação antagonista dos recetores da dopamina do tipo D₂, mas potente ação sobre os recetores D₄, muscarínicos e outros. Apesar de este mecanismo ser ainda um pouco desconhecido, sabe-se que é atribuído à combinação de efeitos dopaminérgicos e serotoninérgicos (30,68). A olanzapina é semelhante à clozapina quanto às características estruturais e propriedades farmacológicas e apresenta uma melhoria quanto à tolerabilidade quando comparada com o haloperidol (30). A ciamemazina é uma molécula derivada da fenotiazina e é dotada de marcada atividade anti-histamínica (69). O tiapride, em termos terapêuticos, é indicado para perturbações do comportamento em casos de demência e de abstinência alcoólica e em discinesias. Farmacologicamente liga-se seletivamente aos recetores D₂ e D₃, não apresentando afinidade para os subtipos dos recetores dos principais neurotransmissores (serotonina, noradrenalina e histamina) (70).

Em relação à farmacocinética dos antipsicóticos, estes são rapidamente absorvidos após administração oral. São muito lipofílicos e ligam-se fortemente a proteínas plasmáticas, à exceção do tiapride, conseguindo uma boa distribuição para tecidos irrigados. São metabolizados hepaticamente pelos enzimas do citocromo P450. O haloperidol é metabolizado através de uma N-desalquilação oxidativa, originando metabolitos inativos biologicamente ou através de uma redução do grupo cetona a um álcool secundário. É excretado pela urina e pelas fezes, sendo que 1% é excretado pela urina na forma não alterada. Quanto ao metabolismo da levomepromazina envolve reações de sulfoxidação e desmetilação, sendo os metabolitos mais relevantes o sulfóxido e a N-monodesmetil, que é um metabolito ativo. Cerca de 1% da dose administrada é excretada pela urina na forma não alterada dentro de 24 h após a administração e 10% é excretado na forma de sulfóxido. A clozapina sofre metabolismo de primeira passagem dando origem à norclozapina (metabolito ativo cujas propriedades farmacológicas são semelhantes às da clozapina, embora mais fracas e menos prolongadas) e ao N-óxido clozapina. Em termos de excreção, é excretada pela urina e pelas fezes essencialmente na forma de metabolitos. A olanzapina também é excretada, em pequena percentagem, pela urina na forma não alterada. Assim do que é metabolizado, 57% é excretado pela urina e 30% pelas fezes na forma dos metabolitos N-desmetil e 2-hidroximetil. A farmacocinética da ciamemazina é

I. Introdução teórica

2. *Substâncias Medicamentosas*

ainda pouco conhecida, mas sabe-se que é metabolizada no fígado, dando origem a dois metabolitos principais os derivados desmetilados e sulfóxido. Ambos os metabolitos são excretados através da urina 72 h após a administração. O tiapride é pouco metabolizado, sendo que cerca de 70 a 75% do medicamento administrado é excretado, na forma inalterada, pela urina no espaço de 24 h. O restante que é metabolizado origina metabolitos inativos (20,25,30,66–73).

Quanto a interações com outros medicamentos, os antipsicóticos não devem ser utilizados simultaneamente com medicamentos pró-arrítmicos e a clozapina, em particular, não deve ser utilizada em conjunto com carbamazepina, cotrimoxol, cloranfenicol, sulfonamidas, entre outros (19).

As reações adversas dos antipsicóticos incluem sintomas e sinais extrapiramidais (movimentos distônicos, síndromes parkinsonianas), sedação, efeitos anticolinérgicos, hipotensão ortostática, arritmias, náuseas, vômitos, dores abdominais, irritação gástrica, erupções cutâneas, entre outras. A clozapina origina ainda agranulocitose (19).

Em casos de sobredosagem verifica-se, em termos gerais, sonolência, sedação, letargia, alucinações, delírio, sintomas extrapiramidais, convulsões, hipotermia, hipotensão, síndrome parkinsoniana grave, coma, entre outros (25,67,69–72).

3. Amostras biológicas

As amostras biológicas são representativas de uma pequena parte do organismo que é mais relevante e indicada para a análise toxicológica, sendo que a qualidade dos resultados analíticos está dependente da qualidade e do tipo de amostra recolhida, bem como da sua preservação, já que uma recolha de quantidade insuficiente de amostra, um inadequado acondicionamento da mesma e/ou um transporte longo sem uma preservação apropriada pode levar a resultados não fidedignos e irreais. Assim, as etapas mais importantes para uma correta análise das amostras biológicas englobam a seleção, a recolha, a preservação e o transporte. Em todo este processo, em casos forenses, é necessário manter a cadeia de custódia, que serve para garantir a origem e todo o processo pelo qual a amostra passou até chegar à análise (74).

A escolha do tipo de amostra a utilizar é determinada pelo caso em estudo, sendo que as mais comuns de empregar em análises toxicológicas *post-mortem* são o sangue (periférico e cardíaco) e a urina, por serem facilmente obtidas e manipuladas. Contudo é o sangue periférico a amostra que melhor pode estabelecer uma correlação com uma eventual intoxicação (15,75,76). Na análise toxicológica *post-mortem* é ainda normal recorrer a amostras de humor vítreo, cabelo, conteúdo gástrico ou fígado (76).

As amostras que podem ser utilizadas na análise toxicológica forense estão enumeradas na tabela 3 (75,77).

A preservação da amostra biológica consiste em reduzir a probabilidade de contaminação e de degradação da mesma por processos químicos, físicos e/ou biológicos (74). Os processos bioquímicos e biológicos que ocorrem após a morte e que resultam em alterações da concentração de alguns medicamentos nas amostras e em dificuldades na sua respetiva confirmação, incluem (78):

- Processos enzimáticos responsáveis pelo metabolismo dos medicamentos no organismo que continuam a atuar após a morte;
- Processos enzimáticos nos quais as enzimas libertadas durante a autólise levam à libertação de compostos exógenos do material celular;
- Processos bacterianos, nos quais as bactérias presentes no corpo utilizam os fármacos como substrato;
- Redistribuição, na qual os fármacos se difundem ao longo do tempo.

Tabela 3. Tipos de amostras biológicas. (75,77)

Amostras biológicas	
<i>Ante-mortem</i>	Sangue periférico
	Urina
	Fezes
	Vômito
	Cabelo (ou pelo corporal)
	Unhas
	Humor vítreo
	Fluido cérebroespinal
	Pele ou gordura subcutânea
	Swabs da pele ou de mucosas (e.g. suor e saliva)
	Mecónio
<i>Post-mortem</i>	Sangue cardíaco
	Conteúdo gástrico
	Bílis
	Fígado
	Cérebro
	Pulmão
	Rins
	Músculo
	Conteúdo intestinal
	Fluido pericárdico
	Medula óssea
	Osso

(As amostras *ante-mortem* podem também ser recolhidas *post-mortem*)

Existem ainda situações (corpos em avançado estado de decomposição, totalmente carbonizados ou casos em que já houve uma total perda de fluidos biológicos) em que as amostras tipicamente recolhidas e analisadas não estão disponíveis e, por isso, é necessário recorrer às amostras designadas por alternativas (15,79).

3.1 Fígado

O fígado é uma dessas amostras alternativas e é amplamente utilizado, porque é um órgão facilmente recolhido durante a autópsia, os analitos e os seus metabolitos estão presentes neste tecido, já que é neste órgão que ocorre o seu metabolismo, originando que a concentração dos analitos sejam entre 10 a 100 vezes superiores quando comparadas com as do sangue, não é afetado pela redistribuição *post-mortem*, como é o caso do sangue, é um dos maiores órgãos do corpo humano e é relativamente fácil de macerar (15,79,80).

Anatomicamente o fígado é um órgão grande, muito vascularizado, localizado na parte superior direita do abdómen, pesando cerca de 1,5 kg. Está dividido em dois lóbulos,

o esquerdo, mais pequeno e que sobrepõe parcialmente o estômago, localizado na parte central do abdómen, e o direito, que ocupa a parte direita do abdómen. As suas principais funções são: o metabolismo de alimentos, a síntese e armazenamento de glicogénio, a libertação de glucose e, a mais relevante para esta dissertação, o metabolismo de tóxicos endógenos e exógenos, sendo o primeiro local do organismo onde ocorre o metabolismo dos medicamentos, essencialmente através dos enzimas do citocromo P450. Deste modo, o metabolismo hepático é considerado o mais importante (79,81).

Visto que o fígado está dividido em dois lóbulos, em termos de amostragem, é aconselhável recolher parte do lóbulo direito, já que este lóbulo está mais distante do estômago e de outros órgãos, diminuindo a quantidade e a extensão da difusão dos medicamentos desde o estômago e o intestino (74).

O fígado é indicado na análise toxicológica de TCA, porque estes ligam-se fortemente às proteínas, bem como para a análise de antipsicóticos da classe das fenotiazinas (74,82). O fígado é ainda exposto a elevadas concentrações de xenobióticos, pois é o primeiro órgão a ser perfundido por estes após estes serem absorvidos pelo intestino, sendo por isso, aconselhável a sua utilização na confirmação qualitativa de medicamentos em casos de intoxicações (81).

Porém, este tipo de amostra apresenta algumas desvantagens: necessidade de homogeneização prévia à extração; observação do efeito de matriz, devido à elevada quantidade de lípidos que o constituem, o que é problemático para a análise instrumental de rotina, e a falta de uma base de dados que ajude na interpretação das concentrações dos medicamentos determinadas (15,79). Contudo, as concentrações medidas estão geralmente dentro dos limites de deteção dos métodos utilizados em análises toxicológicas forenses (79).

4. Preparação de amostras biológicas

Em qualquer análise instrumental de rotina de medicamentos presentes em amostras biológicas existem etapas que é necessário ter em atenção para a determinação desses analitos. Essas etapas englobam a amostragem, a preparação da amostra, o método de análise e os resultados analíticos obtidos (qualitativos e quantitativos) (83,84).

A preparação da amostra é uma das etapas críticas na determinação dos analitos em amostras biológicas, demorando até cerca de 80% do tempo total de análise, pois os analitos estão presentes muitas vezes em concentrações vestigiais nessas amostras e estas são matrizes muito complexas, incompatíveis ou que dificultam a análise instrumental, devido à presença de proteínas, lípidos, água e inúmeros compostos orgânicos (13,84,85). Deste modo, a preparação da amostra tem como finalidade principal a obtenção do analito de interesse numa forma adequada, isolada e concentrada, de forma a ser possível a sua análise pelos métodos instrumentais de análise, aumentando a sensibilidade e seletividade do método, num tempo razoável de análise (84,86,87). Assim, esta preparação pode incluir: redução do volume de amostra e/ou homogeneização, extração do analito da amostra, limpeza e concentração, podendo envolver ainda a derivatização química dos analitos, antes ou após a etapa de extração (83).

A extração é a etapa da preparação mais importante e decisiva e tem como principais objetivos a remoção de proteínas e lípidos presentes nas amostras, bem como de todos os interferentes e compostos que condicionam a análise instrumental e o isolamento dos analitos de interesse (88).

As metodologias de extração variam de acordo com o estado físico da matriz, já que estas podem ser líquidas (como sangue e urina) ou sólidas (como fígado e cabelo), e com as propriedades físico-químicas dos analitos. As amostras sólidas apresentam desafios adicionais em termos de preparação, visto que têm de ser homogeneizadas, de forma a obter-se uma porção líquida mais fácil de extrair; para além disto, existe ainda uma dificuldade acrescida na preparação de *pools* homogêneas para a validação destas metodologias e existe a dificuldade na estimativa da eficiência da extração (vulgo recuperação), dado que as amostras controlo só podem ser fortificados após a homogeneização e desta forma não refletir totalmente as condições das amostras reais (89).

Para a análise de amostras de fígado *post-mortem*, no contexto da toxicologia forense, as metodologias de extração mais utilizadas são: a Precipitação de Proteínas (PP), a Extração Líquido-Líquido (LLE) e a Extração em Fase Sólida (SPE). A SPE apresenta

uma maior seletividade, o extrato obtido através desta apresenta menos interferentes do que os extratos obtidos a partir da PP e da LLE, ou seja, a eficiência da extração por SPE é maior, especialmente para compostos polares. Contudo estes métodos são morosos, laboriosos e por vezes requerem o uso de solventes orgânicos tóxicos (15,16,80,90,91). Outro dos métodos que tem sido, mais recentemente, aplicado à preparação deste tipo de amostras é a Micro-Extração em Fase Sólida (SPME), por ser mais rápido, eficiente, menos dispendioso e não recorrer ao uso de solventes orgânicos, contudo este apresenta a limitação de ter uma baixa eficiência de extração (13,15,16,84,86,87).

Ultimamente tem-se tentado aplicar uma nova metodologia extrativa a amostras de fígado *post-mortem*, designada por QuEChERS (acrónimo inglês de *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe* e pronunciado como “catchers”) (15). Esta metodologia tem sido também aplicada num contexto forense à extração de outro tipo de amostras biológicas, como sangue (14,16,90,92,93) e urina (94). Como esta dissertação se baseia no desenvolvimento de uma metodologia extrativa por QuEChERS, apresenta-se mais à frente uma breve abordagem a esta metodologia de forma a facilitar a compreensão do seu mecanismo de funcionamento.

Em termos da metodologia analítica utilizada, os métodos cromatográficos acoplados à Espectrometria de Massa (LC-MS e GC-MS) têm sido os mais amplamente aplicados à análise dos medicamentos em estudo em amostras biológicas complexas, muito por causa da sua elevada sensibilidade, seletividade e flexibilidade (13,14).

Nas tabelas 4, 5 e 6 é possível verificar quais as metodologias de extração e de análise mais comumente utilizadas na análise dos medicamentos em estudo em amostras biológicas desde 2003.

I. Introdução teórica

4. Preparação de amostras biológicas

Tabela 4. Métodos de extração e técnicas analíticas utilizadas para análise dos medicamentos em estudo presentes em amostras biológicas.

QuEChERS				
Medicamento	Tipo de amostra	Técnica analítica	Eficiência da Extração (%)	Referência
Amitriptilina Tramadol	Sangue	LC-MS	97,2-105 (tramadol) 85-104 (amitriptilina)	(14)
Amitriptilina Tiapride Tramadol	Sangue	GC-MS	92,3 (tramadol) 95,6 (amitriptilina) 73,9 (tiapride)	(90)
Clomipramina Levomepromazina Mirtazapina Olanzapina Sertralina	Sangue	LC-MS/MS	93,2 (clomipramina) 71,2 (Levomepromazina) 61,6 (olanzapina) 98,0 (sertralina) 86,9 (mirtazapina)	(95)
Clomipramina Levomepromazina Mirtazapina Olanzapina Sertralina	Sangue	LC-MS/MS	93,16 (clomipramina) 71,17 (Levomepromazina) 61,62 (olanzapina) 97,97 (Sertralina) 86,88 (mirtazapina)	(96)
Precipitação de Proteínas				
Medicamento	Tipo de amostra	Técnica analítica	Eficiência da Extração (%)	Referência
Haloperidol Levomepromazina	Plasma	UHPLC-MS	37-104	(97)
Mirtazapina, Olanzapina	Plasma	UHPLC-MS	n.d.	(98)
Amitriptilina, Citalopram, Clomipramina, Clozapina , Mirtazapina, Venlafaxina	Soro	UHPLC-MS	101 (mirtazapina) 104 (venlafaxina) 90 (amitriptilina) 96 (citalopram) 72 (clomipramina) 95 (clozapina)	(99)

I. Introdução teórica

4. Preparação de amostras biológicas

Tabela 5. Continuação dos métodos de extração e técnicas analíticas utilizadas para análise dos medicamentos em estudo em amostras biológicas.

Continuação

Micro-extração em Fase Sólida				
Medicamento	Tipo de amostra	Técnica analítica	Eficiência da Extração (%)	Referência
Tramadol	Plasma	HPLC	n.d.	(100)
Venlafaxina	Sangue	GC-NPD	n.d.	(101)
Extração em Fase Sólida				
Medicamento	Tipo de amostra	Técnica analítica	Eficiência da Extração (%)	Referência
Tiapride	Sangue	HPLC-PDA-FL	n.d.	(66)
Clozapina, Haloperidol, Olanzapina	Sangue <i>post-mortem</i>	HPLC-MS/MS	44 (clozapina) 43 (haloperidol) 39 (olanzapina)	(102)
Amitriptilina Clomipramina Fluoxetina Sertralina Trazodona Venlafaxina	Plasma	LC-MS	99	(103)
Trazodona	Plasma	HPLC-UV/DAD	93	
Amitriptilina Trazodona	Plasma	LC-MS/MS	69-102	(104)
Citalopram Fluoxetina	Urina	GC-MS	n.d.	(105)
Ticlopidina	Plasma	GC-MS	84,4-87,3	(106)
Tramadol	Cabelo	GC-MS	90,75	(107)
		HPLC-MS/MS	95,71-98,44	(108)

I. Introdução teórica

4. Preparação de amostras biológicas

Tabela 6. Continuação dos métodos de extração e técnicas analíticas utilizadas para análise dos medicamentos em estudo em amostras biológicas.

Continuação

Extração Líquido-Líquido				
Medicamento	Tipo de amostra	Técnica analítica	Eficiência da Extração (%)	Referência
Amitriptilina, Citalopram Clomipramina, Fluoxetina, Mirtazapina, Sertralina	Plasma	HPLC-UV	84,8-86,3 (amitriptilina) 74,9-76,3 (citalopram) 82,3-83,1 (clomipramina) 83,2-85,9 (mirtazapina) 72,2-73,6 (fluoxetina) 79,2-80,1 (sertralina)	(43)
Amitriptilina Citalopram Levomepromazina Mirtazapina Sertralina Tramadol Venlafaxina	Sangue	UHPLC-MS/MS	90-94 (amitriptilina) 94-97 (citalopram) 81-115 (Levomepromazina) 94-97 (mirtazapina) 82-92 (sertralina) 87-98 (tramadol) 96-100 (venlafaxina)	(109)
Clomipramina	Plasma	HPLC-UV	61,53-71,73	(110)
Clozapina Haloperidol Olanzapina	Sangue <i>post-mortem</i>	HPLC-MS/MS	72 (clozapina) 71 (haloperidol) 64 (olanzapina)	(102)
Clozapina, Olanzapina	Plasma, Soro, Saliva e Sangue	LC-MS/MS	95-107 (clozapina) 77-101 (olanzapina)	(111)
Clozapina, Haloperidol, Olanzapina,	Soro	UHPLC-MS	89,8-96,0 (clozapina) 84,5-89,4 (haloperidol) 84,8-103,1 (olanzapina)	(112)
Trazodona	Plasma	LC-MS/MS	53,1	(113)

(GC-MS – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa; GC-NPD – Cromatografia Gasosa acoplada a Detetor de Azoto e Fósforo; HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência; HPLC-DAD-FL – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detetor de Fotodíodos e Detetor de Fluorescência; HPLC-UV – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detetor de Ultravioleta; HPLC-UV/DAD – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detetor Ultravioleta e de Fotodíodos; LC-MS – Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa; LC-MS/MS – Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massa *tandem*; n.d. – Não Definido; UHPLC-MS – Cromatografia Líquida de Ultra-Eficiência acoplada a Espectrometria de Massa; UHPLC-MS/MS – Cromatografia Líquida de Ultra-Eficiência acoplada a Espectrometria de Massa *tandem*)

5. QuEChERS

Introduzidos em 2003 por Anastassiades *et al.* (114) para a extração de pesticidas de matrizes alimentares, como frutas e vegetais, os QuEChERS, desde então, têm sido bastante utilizados na área alimentar (15,92,115,116), sendo também aplicados à área clínica e, mais recentemente e em menor escala, à toxicologia forense (15,16,92,115). A sua aceitação pela comunidade científica deve-se, principalmente, ao seu baixo custo, à sua rapidez, à sua eficiência e simplicidade de execução (115).

Em termos genéricos, este método engloba o isolamento dos analitos e a limpeza dos extratos, removendo açúcares, lípidos, proteínas, esteróis, pigmentos e excesso de água e é caracterizado pelo uso de um solvente orgânico polar, normalmente acetonitrilo, acetato de etilo ou acetona, para a extração dos analitos de matrizes aquosas, e a adição de sais que facilitam a separação das fases líquidas através da formação de uma camada intermédia entre o solvente de extração e a amostra, apenas não permitindo a concentração dos analitos (115–117).

Assim, a extração por QuEChERS consiste em duas extrações sucessivas: primeiro uma Extração em Fase Única (do inglês *Single-phase Extraction*) e em segundo uma Extração em Fase Sólida dispersiva (d-SPE).

A Extração em Fase Única é uma extração que recorre à adição de um solvente orgânico à amostra em análise, seguida de uma partição líquido-líquido e a promoção do *salting out* através da adição de uma conjugação de sais, que podem ser: sulfato de magnésio (MgSO_4), acetato de sódio ($\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$), cloreto de sódio (NaCl) ou citrato de sódio ($\text{NaC}_6\text{H}_5\text{O}_7$) (90,115,117–119). Esta adição de sais é seguida de uma agitação e de uma centrifugação, permitindo a separação da mistura em três fases (figura 9): a inferior correspondente à fase aquosa; a intermédia correspondente a resíduos da amostra e dos sais e a superior que corresponde à fase orgânica (93).

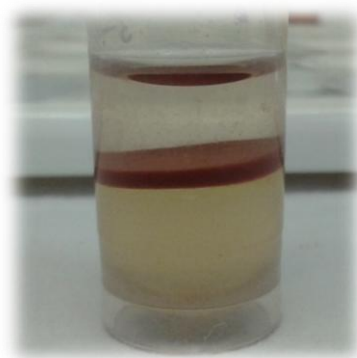


Figura 9. Separação de fases na Extração em Fase Única.

A fase orgânica, que contém os analitos de interesse, é recolhida e utilizada na segunda extração, a d-SPE, a qual recorre a diversos adsorventes para isolar os interferentes, seguindo-se novamente a agitação e centrifugação (93,118). O sobrenadante resultante desta segunda extração pode ser analisado diretamente ou pode ser sujeito, se necessário, a uma concentração (116). A d-SPE tem como intuito a remoção da água

residual e dos restantes interferentes, através dos diferentes adsorventes, que podem ser: *Primary Secondary Amine* (PSA), *octadecyl-modified silica* (C18), *C18 Endcapped* (C18EC), MgSO_4 e/ou *Graphitized Carbon Black* (GCB) (115,117–119).

A composição de sais e adsorventes utilizadas em ambas as extracções de QuEChERS é variável e, por isso, estão disponíveis comercialmente diferentes *kits* com constituições diversas de acordo com o tipo de amostra e analito a que se destinam (117–120).

Relativamente aos sais utilizados na Extração em Fase Única, a função do MgSO_4 e do NaCl consiste em induzir a separação entre o conteúdo de água da amostra e o solvente orgânico; já a função do $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ e do $\text{NaC}_6\text{H}_5\text{O}_7$ é tamponar a amostra de forma a estabilizar o pH (119). Por sua vez, os adsorventes utilizados na d-SPE têm as seguintes funções: o C18/C18EC remove os interferentes não polares, como lípidos; o MgSO_4 remove a água residual; o GCB remove os pigmentos, os esteróis e os interferentes não polares e a PSA remove os açúcares, ácidos gordos, ácidos orgânicos e pigmentos antocianinas (117,119).

As principais vantagens desta metodologia extrativa, para além do seu baixo custo, da sua rapidez, da sua eficiência e da sua simplicidade, já referidas, são: a redução da quantidade de solvente orgânico utilizado (*user-friendly*) comparando com algumas das outras metodologias de extração, bem como a pouca utilização de material de laboratório; a remoção total do uso de solventes clorados; apresentar extratos mais limpos, comparado com a LLE, pelo facto de ser mais fácil isolar a fase orgânica, dado que não se verifica a formação de emulsões; a capacidade de extrair dezenas de compostos simultaneamente; o facto de não ser necessário recorrer a colunas de extração e limpeza, como na SPE, nas quais existe o risco de haver colmatção na extração de amostras sólidas e de não requerer a utilização de vácuo, utilizado na SPE para secar as colunas de extração, diminuindo, deste modo, os custos associados (92,93,115,116).

6. Homogeneização da amostra

Previamente à extração, as amostras de fígado devem ser homogeneizadas adequadamente de forma a possibilitar essa extração e a obtenção de resultados reprodutíveis. Para isso pode-se recorrer a diferentes métodos de homogeneização, manuais ou recorrendo a instrumentação específica. O primeiro recorre normalmente a pressão mecânica manual, que consiste apenas em romper os tecidos pressionando a amostra com um pilão contra um almofariz, na presença de um líquido, normalmente tampões. O material mais comum é vidro, teflon ou aço inoxidável. As desvantagens deste tipo de homogeneização versa no facto de só possibilitar a homogeneização de uma amostra de cada vez e de haver a possibilidade de contaminação cruzada entre amostras. Em relação ao segundo, existem diferentes equipamentos disponíveis para a homogeneização de tecidos, incluindo homogeneizadores mecânicos, criogénicos, de esferas, de ciclos de pressão ou ultrassónicos. Por exemplo, os homogeneizadores criogénicos consistem em congelar a amostra abaixo de uma determinada temperatura com um fluido criogénico, normalmente azoto líquido, fazendo com que em segundos a amostra congele e se fragmente ou os homogeneizadores de ciclos de pressão que aplicam pressões hidrostáticas alternadas em combinação com trituração mecânica para romper os tecidos. A maioria destes métodos de homogeneização, ao contrário dos anteriores têm a vantagem de não haver contaminação cruzada, já que são realizadas em tubos ou *viais* descartáveis (121).

Um método de homogeneização simples, rápido, eficiente e que previne a contaminação cruzada, utiliza o homogeneizador Precellys®24 da *Bertin Technologies*. Este homogeneizador de esferas faz com que as esferas, quando agitadas e aceleradas a uma determinada velocidade e durante um certo tempo, rompam os tecidos. Este homogeneizador é aplicável em diversas áreas, que incluem a biologia molecular e proteómica; a farmacologia e a toxicologia e a análise alimentar e ambiental (122,123).

Em termos práticos, quando se utiliza o Precellys®24 (figura 10), existem parâmetros a ter em consideração e que devem ser otimizados de modo a proporcionarem uma adequada homogeneização, como a quantidade de amostra a homogeneizar, tendo em conta a capacidade dos tubos destinados para este fim, a velocidade, o tempo, o número de ciclos e o tempo de intervalo entre esses ciclos (123).



Figura 10. Processo de homogeneização das amostras de fígado.

7. Validação do método

Um método analítico é um processo que é suscetível de apresentar erros, sejam eles sistemáticos e/ou aleatórios, o que pode levar a alterações significativas no resultado analítico final. Deste modo, é fundamental a demonstração de que o método conduz a resultados críveis e adequados à qualidade pretendida. Esta demonstração consiste no processo de validação do método, que não é mais que um conjunto de experiências que servem para “estabelecer os níveis de desempenho e as limitações de um método analítico e a identificação dos parâmetros que podem condicionar o seu desempenho”. Ou seja, é o “processo de verificação se o método é adequado para o propósito a que se destina” (“*fit for the purpose*”) (12,124).

A implantação da validação do método é essencial tendo em conta a importância da fiabilidade das medições analíticas presentes no dia a dia de qualquer laboratório de química e toxicologia forenses, pois só resultados fiáveis podem conduzir a interpretações toxicológicas corretas e deve ser realizado antes da implementação do método analítico nas análises de rotina. Todas as variáveis que podem afetar o desempenho do método devem ser tidas em consideração e englobam a amostragem, a preparação da amostra, a separação cromatográfica, a deteção dos analitos e a análise dos resultados analíticos obtidos (125,126).

Não há unanimidade quanto à forma como se deve proceder de forma a validar um método analítico, havendo vários documentos publicados por organismos internacionais, tais como a *Food and Drug Administration* (FDA), a Eurachem, a *European Medicines Agency* (EMA), a Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal (Relacre), *International Conference on Harmonisation* (ICH), entre outros, relativos a guias de validação de métodos analíticos (12,124,127–129).

Porém, existe algum consenso quanto aos parâmetros a avaliar aquando da validação de um método analítico de quantificação: seletividade, linearidade, estabilidade, precisão (precisão intermédia e repetibilidade), exatidão e limite de quantificação. Outros parâmetros que também devem ser estudados incluem: limite de deteção, a eficiência da extração ou recuperação, reprodutibilidade e robustez. Em relação a métodos analíticos de confirmação qualitativa os parâmetros de validação mais importantes e comuns são: seletividade, limite de deteção, recuperação, precisão e robustez (125,130).

Aquando da validação de um método analítico deve-se ainda proceder à elaboração de um relatório de validação que deve incluir a definição do sistema a validar (e.g. método,

I. Introdução teórica

7. Validação do método

analitos, matriz biológica), a descrição do procedimento experimental, a identificação dos parâmetros de validação, a definição dos critérios de aceitação relativos a esses parâmetros, os resultados da avaliação dos parâmetros e as conclusões da validação.

II. Materiais e Métodos



1. Reagentes

Os padrões de referência de amitriptilina, mirtazapina, sertralina, trazodona e fentanil foram obtidos à *Cerilliant* (Round Rock, Estados Unidos); o de ciamemazina e de promazina foram adquiridos à *Sigma-Aldrich Corporation* (Steinheim, Alemanha); os padrões de referência de citalopram, clomipramina, fluoxetina, haloperidol, olanzapina e venlafaxina foram obtidos a partir da *Lipomed* (Arlesheim, Suíça); os padrões de referência de clozapina e de levomepromazina foram adquiridos à *Promochem* (Middlesex, Reino Unido) e os padrões de referência de tramadol, de tiapride e de ticlopidina foram fornecidos pela *LGC* (Middlesex, Reino Unido). Todos os padrões de referência apresentavam-se em solução (metanol ou acetonitrilo) numa concentração de 1 mg/mL.

O metanol p.a. foi adquirido à *Fisher Scientific* (Porto Salvo, Portugal); o metanol para GC, o ácido acético (glacial) 100% e o acetato de etilo à *Merck* (Darmstadt, Alemanha) e o acetonitrilo à *Fluka/Sigma-Aldrich Corporation* (Steinheim, Alemanha).

A água ultra-pura utilizada foi obtida através de um sistema de purificação de água modelo Simplicity 185 (com lâmpada de UV) da *Millipore* (Bedford, EUA) a qual apresentava uma resistividade de $18,2 \text{ M}\Omega\text{cm}^{-1}$ à temperatura ambiente.

Os kits de extração de QuEChERS foram adquiridos à *Agilent Technologies* (Waldbronn, Alemanha) e são os seguintes:

- 6 g de MgSO_4 e 1,5 g de $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$;
- 25 mg de PSA, 25 mg de C18EC e 150 mg de MgSO_4 ;
- 25 mg de C18 e 150 mg de MgSO_4 ;
- 50 mg de PSA, 50 mg de C18, 7,5 mg de GCB e 150 mg de MgSO_4 .

2. Soluções

- Mistura Padrão medicamentos QuEChERS (5, 10, 20 e 50 µg/mL)

Para um balão volumétrico de 10 mL de capacidade contendo 1 mL de acetonitrilo pipetou-se 50 µL das soluções padrão de referência de haloperidol, levomepromazina e sertralina, 100 µL das soluções padrão de referência de amitriptilina, ciamemazina, citalopram, clomipramina, clozapina, fluoxetina, mirtazapina, olanzapina e tramadol, 200 µL das soluções padrão de referência de ticlopidina, trazodona e venlafaxina e 500 µL da solução padrão de tiapride e completou-se com acetonitrilo até perfazer 10 mL. Homogeneizou-se por inversão. Armazenou-se entre 2 e 8°C ao abrigo da luz.

- Mistura Padrão medicamentos QuEChERS Calibradores (6, 10, 24, 60 e 120 µg/mL)

Para um balão volumétrico de 10 mL de capacidade contendo 1 mL de acetonitrilo pipetou-se 60 µL das soluções padrão de referência de ciamemazina, clozapina e trazodona, 100 µL das soluções padrão de referência de amitriptilina, levomepromazina, citalopram, clomipramina e tramadol, 240 µL das soluções padrão de referência de haloperidol, mirtazapina, sertralina, ticlopidina e venlafaxina, 600 µL da solução padrão de trazodona e fluoxetina e 1200 µL da solução padrão de tiapride e completou-se com acetonitrilo até perfazer 10 mL. Homogeneizou-se por inversão. Armazenou-se entre 2 e 8°C ao abrigo da luz.

- Mistura Padrão medicamentos QuEChERS Controlos (6, 10, 24, 60 e 120 µg/mL)

Para um balão volumétrico de 10 mL de capacidade contendo 1 mL de acetonitrilo pipetou-se 60 µL das soluções padrão de referência de ciamemazina, clozapina e trazodona, 100 µL das soluções padrão de referência de amitriptilina, levomepromazina, citalopram, clomipramina e tramadol, 240 µL das soluções padrão de referência de haloperidol, mirtazapina, sertralina, ticlopidina e venlafaxina, 600 µL da solução padrão de trazodona e fluoxetina e 1200 µL da solução padrão de tiapride e completou-se com acetonitrilo até perfazer 10 mL. Homogeneizou-se por inversão. Armazenou-se entre 2 e 8°C ao abrigo da luz.

- Padrão Interno Confirmação (Promazina 10 µg/mL)

Para um balão volumétrico de 10 mL de capacidade contendo 1 mL de metanol p.a. pipetou-se 100 µL de promazina 1 mg/mL e completou-se com metanol p.a. até perfazer 10 mL. Homogeneizou-se por inversão. Armazenou-se entre 2 e 8°C ao abrigo da luz.

- Padrão Interno Quantificação (Fentanil 1 µg/mL)

Para um balão volumétrico de 10 mL de capacidade contendo 1 mL de metanol p.a. pipetou-se 1 mL de fentanil 10 µg/mL e completou-se com metanol p.a. até perfazer 10 mL. Homogeneizou-se por inversão. Armazenou-se entre 2 e 8°C ao abrigo da luz.

- Solução 1% ácido acético em acetonitrilo

Para um balão volumétrico de 100 mL de capacidade contendo 10 mL de acetonitrilo pipetou-se 1 mL de ácido acético (glacial) 100% e completou-se com acetonitrilo até perfazer 100 mL. Homogeneizou-se por inversão. Armazenou-se entre 2 e 8°C ao abrigo da luz.

- Solução 0,1% ácido acético em acetonitrilo

Para um balão volumétrico de 100 mL de capacidade contendo 10 mL de acetonitrilo pipetou-se 100 µL de ácido acético (glacial) 100% e completou-se com acetonitrilo até perfazer 100 mL. Homogeneizou-se por inversão. Armazenou-se entre 2 e 8°C ao abrigo da luz.

3. Equipamentos

Os equipamentos utilizados na elaboração deste trabalho foram:

- Balança Analítica, modelo 770-13, da *Kern & Sohn GmbH* (Balingen, Alemanha)
- Centrífuga, modelo Megafuge 1.0, da *Thermo-Heraeus* (Osterode, Alemanha)
- Centrífuga, modelo Centrifuge 5424 da *Eppendorf* (Madrid, Espanha)
- Cromatógrafo de gases modelo 6890N da *Agilent Technologies* (Waldbronn, Alemanha) acoplado a um Espectrómetro de Massa 5973 Inert da *Agilent Technologies* (Waldbronn, Alemanha) e dotado de um injetor automático modelo 7683 da marca *Agilent Technologies* (Waldbronn, Alemanha)
- Dispensador, modelo Multipipette plus da *Eppendorf* (Madrid, Espanha)
- Evaporador de amostras, modelo TurboVap LV da *Caliper* (Cambridge, Reino Unido)
- Homogeneizador, modelo Precellys®24, da *bertin Technologies* (Vecsys, França)
- Micropipetas automáticas de 10-100 µL e de 100-1000 µL, modelo Reference da *Eppendorf* (Madrid, Espanha)
- Vórtex mixer, da *Retsch* (Haan, Alemanha)
- Sistema de purificação de água, modelo Simplicity, da *Millipore* (Bedford, Estados Unidos)

4. Condições Cromatográficas

Os extratos obtidos foram injetados no GC-MS. A técnica de ionização usada foi a Ionização Eletrônica, modo positivo (70eV). O analisador de massa foi um analisador do tipo Quadrupolo.

O modo de injeção foi em modo *split* com uma razão de 1:10, sendo o volume de injeção de 2 µL. O gás de arraste (fase móvel) foi hélio fornecido pela *Gasin* (Portugal) com um fluxo constante de 1,1 mL/min.

Para realizar a separação cromatográfica recorreu-se a uma coluna capilar da *Agilent Technologies* (Waldbronn, Alemanha) de sílica fundida HP-5MS (fase estacionária de fenilmetilpolisiloxano 5%) com 30 m de comprimento, 250 µm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme.

A temperatura do injetor e do detetor (interface) foi definida para os 280°C. A temperatura do forno estava inicialmente definida nos 150°C, durante 0,50 minutos, aumentando até aos 290°C, com um incremento de 5°C/min, temperatura na qual se manteve durante 8,00 minutos.

O modo de aquisição do Espectrómetro de Massa foi em Monitorização Seletiva de Iões (SIM), sendo os iões monitorizados, de acordo com o respetivo tempo de retenção (T_r), os apresentados na tabela 7.

O atraso do solvente (do inglês *solvent delay*) foi de 5 minutos.

Os *liners* utilizados foram silanizados e o injetor foi limpo a cada 100 análises, de forma a evitar a diminuição da sensibilidade.

A aquisição e tratamentos dos dados foram obtidos com o *software* Enhanced ChemStation MSD ChemStation E.02.00.493 (1989-2008) da *Agilent Technologies* (Waldbronn, Alemanha).

5. Amostras biológicas em estudo

Para este trabalho as amostras de fígado utilizadas como amostras brancasⁱ foram colhidas *post-mortem*, nos anos de 2011 e de 2012, durante autópsias médico-legais efetuadas no Serviço de Patologia Forense da Delegação do Sul do INMLCF, I.P. ou nos Gabinetes Médico-legais que atuam na sua dependência. As amostras foram conservadas por congelação a -10°C.

i – por amostra branca entende-se uma amostra cuja matriz é equivalente à das amostras a analisar mas isenta da(s) substância(s) a pesquisar.

Tabela 7. Iões monitorizados (sublinhado encontra-se o ião utilizado na quantificação) e tempo de retenção esperado para cada medicamento em estudo.

Medicamento	T _r (min)	Iões monitorizados (m/z)
Amitriptilina	16,5	<u>202</u> ; 215; 189
Ciamemazina	23,0	<u>323</u> ; 223; 58
Citalopram	20,1	<u>238</u> ; 324; 208
Clomipramina	20,2	<u>269</u> ; 314; 227
Clozapina	27,1	<u>243</u> ; 256; 192
Fentanil	25,0	<u>245</u>
Fluoxetina	10,5	<u>309</u> ; 251; 162
Haloperidol	28,1	<u>224</u> ; 237; 206
Levomepromazina	22,0	<u>328</u> ; 228; 58
Mirtazapina	17,5	<u>265</u> ; 195; 221
Olanzapina	25,1	<u>242</u> ; 312; 229
Promazina	18,7	<u>284</u>
Sertralina	19,5	<u>274</u> ; 304; 262
Tiapride	26,4	<u>86</u> ; 213; 256
Ticlopidina	14,9	<u>110</u> ; 263; 125
Tramadol	12,1	<u>263</u> ; 135; 58
Trazodona	34,5	<u>205</u> ; 231; 278
Venlafaxina	14,6	<u>134</u> ; 179; 58

(m/z – razão massa/carga)

6. Identificação dos compostos

A identificação dos compostos presentes nas amostras biológicas por GC-MS em modo de aquisição SIM, segundo a Agência Mundial Anti-Doping (do inglês *World Anti-Doping agency*, WADA), requer o reconhecimento de três iões presentes no espectro de massa, representados na tabela 7, bem como a monitorização das suas intensidades relativas (131).

A intensidade relativa, correspondente à percentagem da intensidade do ião mais intenso, designado por pico base, foi determinada pela integração da área do pico cromatográfico selecionado e normalizado ao pico base (que corresponde a 100%) e foi verificada pela comparação com o observado numa amostra controlo, devendo estar de acordo com os intervalos discriminados na tabela 8 (131).

Tabela 8. Intervalos máximos de tolerância permitidos para as intensidades relativas dos iões de diagnóstico, monitorizados em modo SIM.

Intensidade relativa (% relativa ao pico base)	Intervalo máximo de tolerância permitido
> 50	± 10 (absoluta)
25 – 50	± 20 % (relativa)
5 – 25	± 5 (absoluta)
<5	± 50 % (relativa)

Para além disto, na análise de confirmação qualitativa por GC-MS têm de ser respeitados, de acordo com a WADA, os seguintes critérios (131):

- Razão Sinal-Ruído (S/N) (razão entre o sinal do ião diagnóstico menos intenso e o sinal correspondente ao ruído da linha de base) dos sinais cromatográficos tem de ser superior a 3. Esta determinação é realizada com recurso ao software do equipamento através da comparação da intensidade relativa do ião diagnóstico com a intensidade relativa da razão m/z da linha de base adjacente ao pico do composto;
- A variação do T_r do composto tem de ser inferior a 2% ou a $\pm 0,1$ minutos comparativamente ao T_r do mesmo composto na amostra de referência (controlo);
- O tempo de retenção relativo (T_{rR}) do sinal cromatográfico da substância a analisar tem de ser inferior ou igual a 1% ao da substância de referência presente na amostra controlo e é determinado segundo a equação 1:

$$\text{Equação 1} \quad T_{rR} = \frac{T_r \text{ composto}}{T_r \text{ Padrão Interno}}$$

No caso de métodos cromatográficos hifenados, em particular no GC-MS, outro aspeto a ter em atenção é o *Tune*, isto é, a calibração do espectrómetro. Deve verificar-se a percentagem de água e de oxigénio, assim como a abundância relativa do ião 502 e a voltagem do electromultiplicador, sempre que se procede à limpeza do injetor e à substituição do *liner*, de modo a mostrar que o equipamento se encontra em condições para que se possa proceder à análise e, também, para verificar a existência de possíveis fugas que podem comprometer o equipamento. A percentagem de água tem de ser inferior a 10; a de oxigénio inferior a 2; a abundância relativa do ião 502 deve ser superior a 2% e a voltagem inferior a 2800V.

7. Metodologia

7.1 Extração QuEChERS

7.1.1 Pré-tratamento da Amostra

A amostra de fígado, armazenada a -10°C , foi colocada a descongelar até atingir a temperatura ambiente. Seguiu-se a homogeneização da mesma, que consistiu em transferir 0,5 g de amostra para um tubo de 2 mL, com 6 esferas de aço inoxidável e adicionar 800 μL de água ultra-pura. Colocou-se no homogeneizador de esferas (Precellys®24 da *Bertin Technologies*) a 6800 rotações em 3 ciclos de 30 s com intervalos de 30 s entre cada ciclo. Seguidamente procedeu-se a uma centrifugação a 10000 rpm durante 5 min e retirou-se o sobrenadante obtido.

Este pré-tratamento foi efetuado em duplicado de forma a obter o volume necessário para a extração.

7.1.2 Metodologia de Extração em Fase Única

Do sobrenadante obtido transferiu-se 1 mL para um tubo de 10 mL e adicionou-se 500 μL de água ultra-pura, 50 μL de Promazina 10 $\mu\text{g/mL}$ ou 25 μL de Fentanil 1 $\mu\text{g/mL}$, para o método qualitativo e quantitativo, respetivamente, 0,5 g de MgSO_4 e $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ (4:1) e, por fim, 1,5 mL da solução de ácido acético a 1% em acetonitrilo. Agitou-se durante 10 s recorrendo ao vórtex e centrifugou-se a 4400 rpm durante 2 min.

7.1.3 Metodologia de Extração em Fase Sólida dispersiva

O sobrenadante obtido na extração anterior foi transferido para um tubo contendo 150 mg de MgSO_4 e 25 mg de C18. Agitou-se manualmente durante 10 s e centrifugou-se a 4400 rpm por 3 min.

7.1.4 Concentração

O sobrenadante obtido em 7.1.3 foi transferido para um tubo de vidro e colocado a secar sob uma corrente de azoto a 35°C (até à secura). Redissolveu-se em 75 μL de metanol para GC, transferiu-se para um *vial* e selou-se.

8. Quantificação

Para a quantificação dos analitos em amostras biológicas podem ser empregues diferentes tipos de métodos: curva de calibração analítica, método de adição de padrão, padrão interno (PI) ou externo, fator de resposta, entre outros. Sendo que o método deve ser escolhido pelo laboratório conforme a adequabilidade de cada um deles às medições pretendidas. Após a definição do método de quantificação é necessário estabelecer critérios (tais como a linearidade, o tipo de ajuste polinomial e os coeficientes de correlação (r) e de determinação (R^2)) para aceitar as calibrações obtidas (132).

Assim, a quantificação baseou-se em estabelecer uma relação entre a concentração do analito na amostra e a resposta instrumental correspondente (razão entre a área do pico cromatográfico do ião de quantificação e a área do pico cromatográfico do PI). Esta relação foi estabelecida através da fortificação com os analitos em estudo, a concentrações conhecidas, de amostras brancas, isentas dos analitos em estudo, e determinou-se a correlação entre essas concentrações e as respostas instrumentais obtidas na sua análise (132–135).

Neste trabalho optou-se pela aplicação do método do PI, no qual uma substância conhecida (PI) é adicionada à amostra, a uma dada concentração, antes de se proceder à extração e análise da mesma. Este método é vantajoso na medida em que minimiza as variações introduzidas ao longo do processo de análise, compensando algumas perdas decorrentes de erros do método, quer no processo extrativo quer no processo instrumental de análise (134,135).

8.1 Seleção do Padrão Interno

O PI deve ser semelhante ao analito em estudo, não deve reagir com o analito ou com outro qualquer componente da matriz, não deve fazer parte da amostra e, após a análise cromatográfica, deve ficar separado de todas as substâncias presentes na amostra. Sendo que o último critério quando aplicado em análises por MS não é relevante, visto que cada composto produz um espectro característico. O PI ideal será o deuterado do composto em estudo, contudo este tipo de padrões deuterados são bastante dispendiosos, o que faz com que se opte por outro tipo de compostos utilizados como PI (134). Neste estudo foram selecionados como PI a promazina, para validação do método de confirmação qualitativa, e o fentanil, para validação do método quantitativo. A promazina adequa-se a este estudo visto ser um antipsicótico, pertencendo ao mesmo grupo que uma grande parte dos analitos

em estudo, e porque não está disponível comercialmente em Portugal. Já o Fentanil é um analgésico estupefaciente, aplicado como PI visto ser o composto utilizado como tal no método de quantificação de medicamentos em amostras de sangue validado no Serviço de Química e Toxicologia Forenses (SQTF). Para além disso, verifica-se a existência de grande sensibilidade para a sua deteção, é um composto muito estável que permite corrigir as perdas que possam ocorrer durante a análise e o T_r deste composto (cerca de 25 minutos), faz com que seja detetado sem outras interferências e no qual nenhum dos analitos em estudo é eluído (136,137).

9. Estratégia de otimização do método

Durante o desenvolvimento do método procurou-se encontrar as condições ótimas mantendo, ao mesmo tempo, a simplicidade e a rapidez do método. Assim, recorreu-se a uma otimização univariada, variando um fator de cada vez, na qual se avaliaram os seguintes fatores: tipo e volume de solvente de extração; percentagem de ácido acético no solvente de extração; quantidade de sais ($MgSO_4$: $NaC_2H_3O_2$ (4:1)) adicionada na Extração em Fase Única; tempo de agitação e de centrifugação da Extração em Fase Única; composição dos adsorventes utilizados na d-SPE e tempo de agitação e de centrifugação na d-SPE. Estes fatores foram otimizados segundo a eficácia da extração.

9.1 Extração em Fase Única

9.1.1 Solvente de extração e acidificação

Os solventes orgânicos mais aplicados às extrações de medicamentos e dos seus metabolitos de amostras biológicas incluem: clorofórmio, acetato de etilo, ambos imiscíveis em água, e acetonitrilo e metanol, estes últimos miscíveis em água (93). Em relação aos solventes orgânicos mais aplicados à metodologia de extração por QuEChERS (no contexto de análise de pesticidas), a acetona, o acetonitrilo e o acetato de etilo são os mais utilizados (138).

A acetona e o acetonitrilo são vantajosos na medida em que são miscíveis com a água e, por isso, facilitam uma extração em fase única. Contudo, quando se utiliza acetona para proceder à extração é necessário adicionar outros solventes apolares de forma a que seja possível a separação entre a fase orgânica e a fase aquosa. Esta adição não é necessária quando se utiliza acetonitrilo, visto que a separação entre as fases é promovida pela adição de sais. Para além disso, o acetonitrilo permite ainda que sejam extraídas menores quantidades de lípidos provenientes da amostra, fazendo com que se verifique uma menor

interferência na análise instrumental. Outra vantagem da utilização de acetonitrilo versa no facto de que após a partição, ou seja, a separação de fases (aquosa/orgânica), se estiver presente água residual, que afeta a análise instrumental, esta pode ser removida pela adição de agentes de desidratação, como é o caso do MgSO_4 . No caso dos pesticidas, quando acidificado o acetonitrilo promove maiores recuperações de compostos mais instáveis. A desvantagem mais relevante deste solvente comparando com os outros solventes referidos é o facto de ser mais tóxico, mas em muito menor escala que os solventes clorados (114,138).

O acetato de etilo apresenta como desvantagem a menor capacidade de extração de compostos básicos ($\text{pK}_a > 4$) (138).

O volume de solvente de extração utilizado foi também avaliado por Anastassiades *et al.* (114), verificando qual a relação entre o volume de solvente e a quantidade de amostra seria a mais indicada para uma extração eficiente. Ficou demonstrado que 1 mL de solvente é satisfatório para a extração de 1 g de amostra, contudo isto verifica-se para a análise de pesticidas em amostras alimentares, podendo esta proporção amostra/solvente não ser a mais indicada para análise de medicamentos em amostras de fígado.

No estudo de Matsuta *et al.* (93), aplicado à extração de medicamentos de amostras de sangue, verificou-se que as maiores recuperações eram obtidas utilizando acetonitrilo acidificado com ácido acético como solvente orgânico, comparativamente com a utilização de acetato de etilo.

9.1.2 Adição de Sais, agitação e separação de fases/partição líquido-líquido

Aquando da adição dos sais (MgSO_4 e $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ (4:1)) verifica-se a ocorrência de uma reação exotérmica, porque o MgSO_4 , para além de auxiliar a separação entre o conteúdo de água da amostra e o solvente orgânico, quando hidratado, produz um aumento da temperatura da amostra (entre 40 a 45°C) durante a etapa de partição, acelerando a extração nesta etapa (114,138).

O MgSO_4 , solúvel em água e que fornece um pH neutro, é o sal mais adequado, comparado por exemplo com o Na_2SO_4 , porque permite uma melhor separação entre as fases, aquosa e orgânica, visto que ao ligar-se às moléculas de água endurece estabelecendo uma camada intermédia sólida que separa as duas fases líquidas. O MgSO_4 diminui ainda a quantidade de colesterol obtida no extrato após a extração. O $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$, como já referido, tampona a amostra estabilizando o pH (93,119).

Após a adição dos sais e do solvente orgânico procede-se a uma agitação, de modo a conseguir um maior contacto entre a amostra, o solvente orgânico e os sais, recorrendo ao vórtex. A agitação deve ser efetuada logo após a adição dos sais de forma a impedir a formação de aglomerados de MgSO_4 (114,138).

Após a adição do solvente orgânico, dos sais e da agitação, na Extração em Fase Única, deve-se proceder a uma centrifugação imediata para se obter uma boa partição, já que a fase orgânica (acetonitrilo) tende a diminuir com o tempo (16).

9.2 d-SPE

Nesta segunda extração recorre-se à utilização de adsorventes que possibilitam a limpeza do extrato, eliminando os restantes interferentes, pois a presença destes pode impossibilitar a obtenção ou diminuir a qualidade dos resultados analíticos aquando da análise cromatográfica e a remoção de água residual, que permite um extrato final mais apolar, o que facilita a precipitação dos componentes mais polares. Assim, esta d-SPE apresenta vantagens em relação à limpeza por SPE: não necessita de um suporte físico (colunas), de vácuo, de acondicionamento prévio, nem de vários solventes (114,138). Os adsorventes, referidos anteriormente, são: PSA, C18, GCB e/ou MgSO_4 .

Deste modo, é importante definir quais os adsorventes que devem ser aplicados na limpeza dos extratos provenientes de amostras de fígado *post-mortem* em estudo, bem como o tempo de agitação e centrifugação a que devem ser sujeitos.

10. Validação do método

Como este trabalho consiste no desenvolvimento de um novo método analítico não baseado num método de referência ou normalizado (método interno) (124) é necessário validar o método, de forma a garantir que o seu desempenho é adequado à confirmação qualitativa e quantitativa das substâncias medicamentosas em amostras de fígado *post-mortem* com recurso à extração por QuEChERS e só após isto se pode afirmar que os resultados obtidos são confiáveis e que o método pode ser implementado. Os parâmetros de validação do método analítico apresentam-se enumerados na tabela 9 (125,128–130).

É de referir que como PI utilizou-se a promazina na validação dos parâmetros correspondentes ao método qualitativo e o fentanil para o estudo dos parâmetros avaliados na validação do método quantitativo.

Tabela 9. Parâmetros de validação do método analítico de confirmação e quantificação por GC-MS de medicamentos em amostras de fígado *post-mortem* com recurso a extração por QuEChERS.

Parâmetro	Confirmação	
	Qualitativa	Quantitativa
Especificidade/Seletividade	✓	✓
Capacidade de identificação	✓	✓
Eficiência da extração	✓	✓
Avaliação do efeito de matriz	✓	✓
Limite de Detecção	✓	✓
Limite de Quantificação		✓
Arrastamento (<i>carryover</i>)	✓	✓
Linearidade e modelo de calibração		✓
Precisão intermédia		✓
Repetibilidade		✓
Exatidão		✓
Robustez	✓	✓

10.1 Especificidade/Seletividade

Seletividade é entendida como sendo a capacidade que um método analítico possui para identificar, diferenciar e quantificar o analito de interesse numa matriz complexa sem interferência de outros compostos que possam estar presentes na amostra (124,129,134).

Este termo é facilmente e muitas vezes referido indiscriminadamente como especificidade, gerando alguma confusão. Um método específico é entendido como um método instrumental que fornece resposta para apenas uma substância, enquanto que um método seletivo é aquele que responde a diversas substâncias simultaneamente, mas que consegue distinguir a resposta de uma substância de todas as outras respostas. Assim, segundo o *International Union of Pure and Applied Chemistry* (IUPAC) deve ser usado apenas o termo seletividade de forma a evitar essas confusões. Neste trabalho e tendo em conta que os métodos cromatográficos hifenados permitem normalmente produzir respostas para várias substâncias e que a espectrometria de massa é considerada uma técnica seletiva, o termo seletividade é considerado mais apropriado (134).

Para a avaliação da seletividade foram selecionadas um total de 15 amostras de fígado *post-mortem* isentas dos analitos em estudo e representativas das amostras

analisadas pelo SQTF. A partir destas 15 amostras foram preparadas 10 *pools* de 4 origens distintas (a mesma amostra foi utilizada em várias *pools*, mas de forma a que cada *pool* apresentasse uma composição de amostras de quatro origens diferentes). A utilização de 15 amostras está de acordo com o Guia de validação da FDA que define que para a avaliação da seletividade devem ser obtidas pelo menos 6 amostras de diferentes origens (129). A utilização de *pools* em vez da utilização de amostras unitárias, por sua vez, afigura-se mais apropriado, devido à heterogeneidade das amostras habitualmente analisadas por rotina no SQTF.

De cada *pool* (após homogeneização) foram retiradas duas alíquotas (1 g) para análise: a uma alíquota não se adicionou nenhum dos analitos em estudo, apenas se fortificou com 500 ng/g de PI (alíquota negativa); à segunda alíquota adicionou-se 125 ng/g de haloperidol, levomepromazina e sertralina, 250 ng/g de amitriptilina, ciamemazina, citalopram, clomipramina, clozapina, fluoxetina, olanzapina, mirtazapina e tramadol, 500 ng/g de ticlopidina, trazodona e venlafaxina, 1250 ng/g de tiapride e 500 ng/g de PI (alíquota positiva) e aplicou-se o procedimento extrativo desenvolvido a ambas as alíquotas. Finalmente, compararam-se os resultados obtidos nos extratos das *pools* com os resultados obtidos no controlo, isto é, numa matriz fortificada com os analitos em estudo, analisada simultaneamente e nas mesmas condições de análise.

Em conformidade com os critérios para identificação dos compostos por GC-MS em modo SIM definiu-se que para um método ser seletivo a percentagem de falsos positivos tem de ser 0, a percentagem de falsos negativos tem de ser inferior a 10 e não podem existir interferências no T_r e nos iões selecionados para cada um dos analitos. Adicionalmente é necessária a confirmação inequívoca da presença dos analitos nas alíquotas positivas, através da confirmação dos seguintes critérios: presença dos três iões de diagnóstico apresentados na tabela 7, no T_r esperado para o analito; variação do T_{rR} ser inferior ou igual a 1%; intensidades relativas dos iões compreendidas nos intervalos de aceitação definidos na tabela 8 e razão S/N dos iões superior a 3.

Para além disto, numa segunda fase, preparou-se uma nova *pool*, da qual foram retiradas quatro alíquotas (1 g): a três dessas alíquotas foram adicionados 500 ng/g de PI e 500 ng/g de 91 substâncias diferentes dos analitos em estudo, e que incluem substâncias provenientes de diferentes grupos que podem ser encontradas nas análises de rotina do SQTF: Anfetaminas, Benzodiazepinas, Canabinóides, Canabinóides Sintéticos, Cocaína e seus metabolitos, Catinonas, Estimulantes sintéticos do tipo anfetamínico, Pesticidas e Opióides (Anexo A), de forma a avaliar se a presença destas substâncias iria afetar a

identificação dos analitos em estudo; na quarta alíquota adicionou-se 125 ng/g de haloperidol, levomepromazina e sertralina, 250 ng/g de amitriptilina, ciamemazina, citalopram, clomipramina, clozapina, fluoxetina, olanzapina, mirtazapina e tramadol, 500 ng/g de ticlopidina, trazodona e venlafaxina, 1250 ng/g de tiapride, de modo a avaliar se algum dos analitos em estudo interferia na identificação do PI (Promazina).

10.2 Capacidade de Identificação

Como o próprio nome indica a capacidade de identificação consiste em demonstrar que o método em validação possibilita inequivocamente a identificação dos analitos em estudo. Assim, este parâmetro é avaliado simultaneamente com a especificidade/seletividade e consistiu em aplicar os critérios de identificação referidos anteriormente às alíquotas fortificadas com os analitos em estudo durante a avaliação da especificidade/seletividade e a verificação se a percentagem de falsos negativos é igual ou inferior a 10.

10.3 Avaliação do Efeito de Matriz

Efeito de matriz (EM) é definido, segundo a FDA, como a “alteração direta ou indireta ou interferência na resposta instrumental devido à presença de analitos não intencionais ou de outras substâncias presentes na matriz que interferem na análise da amostra” (129). Pode ainda ser descrito como a diferença entre a resposta obtida pelo Espectrómetro de Massa para um dado analito numa solução-padrão e a resposta dada para o mesmo analito num extrato resultante de uma matriz biológica, nas mesmas condições analíticas.

O efeito de matriz é um dos parâmetros de validação recomendados por várias instituições internacionais, como a FDA, para métodos que acoplem LC-MS, uma vez que pode reduzir a sensibilidade do método (139). Apesar de este estudo não se basear na LC-MS, decidiu-se avaliar o efeito de matriz na validação do método desenvolvido devido ao facto das amostras analisadas, fígados *post-mortem*, serem muito complexas e diversas, podendo afetar a análise dos analitos em estudo.

Assim, para avaliar o efeito de matriz recorreu-se ao método de fortificação pós-extração, que se baseou em fortificar com os analitos de interesse (125, 250, 500 e 1250 ng/g) e com o PI (500 ng/g) cinco alíquotas de água desionizada (sem matriz) e cinco alíquotas de fígado *post-mortem* (com matriz) após a extração por QuEChERS. Todas as alíquotas foram analisadas nas mesmas condições instrumentais.

A avaliação do EM foi determinada com recurso à equação 2 e se compreendido entre 90 e 100% significa que a identificação do analito não é afetada pela matriz.

Equação 2

$$EM(\%) = \left(\frac{\bar{A} \text{ c/matriz}}{\bar{A} \text{ s/matriz}} \right) \times 100$$

Em que,

$\bar{A} \text{ c/matriz}$ = Média das áreas absolutas do pico cromatográfico do ião de quantificação das alíquotas com matriz fortificadas após a extração por QuEChERS;

$\bar{A} \text{ s/matriz}$ = Média das áreas absolutas do pico cromatográfico do ião de quantificação das alíquotas sem matriz fortificadas após a extração por QuEChERS.

10.4 Linearidade ou modelo de calibração

A escolha de um modelo de calibração apropriado é necessária para uma adequada quantificação e, por isso, deve-se avaliar a relação entre a concentração do analito na amostra e a resposta analítica correspondente (130,133). A linearidade é entendida como a capacidade do método em fornecer respostas analíticas (variável dependente) diretamente proporcionais à concentração do analito (variável independente), numa determinada gama de concentrações, obtendo-se uma curva de calibração (129,134,140–142).

Os pontos de calibração ou calibradores utilizados para estabelecer essa relação devem ser preparados na matriz em estudo e as suas concentrações devem incluir toda a gama de calibração, sendo uniformemente distribuídas ao longo desta (124,129,130,133). A maioria das recomendações internacionais indicam que devem ser utilizados entre cinco a oito pontos de calibração (129,130,133). Outros autores sugerem que é mais vantajoso utilizar um menor número de pontos de calibração, embora com aplicação de mais replicados, já que facilita a deteção de pontos anómalos ou a necessidade de utilizar fatores de ponderação na calibração (130,142).

Foram preparadas quinze curvas de calibração, uma por analito, através da fortificação com os analitos em estudo de alíquotas (1 g) de uma *pool* de fígados brancos num total entre sete e nove calibradores distribuídos ao longo da gama de trabalho (tabela 10), não efetuando réplicas. A todos eles adicionou-se fentanil (PI) a 25 ng/g e aplicou-se o método analítico desenvolvido.

A curva de calibração que melhor se ajusta ao conjunto de resultados experimentais obteve-se por aplicação do método dos mínimos quadrados, subentendendo-se que as diferenças entre a concentração real e a nominal (resíduos) apresentam distribuição normal (valor nulo), sejam independentes e que se verifique homogeneidade de variâncias ao longo da gama de trabalho (homocedasticidade) (124,143).

Quanto aos critérios de aceitação das curvas de calibração definiu-se que o valor do r e do R^2 tem que ser superior a 0,99; que a observação visual da distribuição dos resíduos ao longo dos valores de concentração não deve revelar tendências; que na interceção da curva de calibração com o eixo das ordenadas, o valor zero deve estar incluído num intervalo de confiança de 95% e que se devem excluir os dados cujos valores residuais sejam superiores ao dobro do erro-padrão ($S_{y/x}$) da curva de calibração (valores aberrantes) (134,140).

No entanto, as estimativas obtidas na regressão e a representação gráfica da função não são suficientes para estabelecer a linearidade (124). Por isto, aplicou-se o teste de Mandel, com o qual se avaliou qual dos modelos – linear ou não linear – proporcionava o melhor ajuste dos pontos da curva de calibração (124,135,144). Sendo assim, foi necessário determinar a diferença entre a variância da correlação linear e a variância da correlação quadrática – equação 3 (124).

Equação 3:
$$DS^2 = (N - 2) \times S_{y/x}^2 - (N - 3) \times S_{y2}^2$$

Onde,

N representa o número de pontos de calibração;

$S_{y/x}^2$ representa a variância da correlação linear;

S_{y2}^2 representa a variância da correlação não linear (quadrática).

Calculou-se o valor de teste (F_{cal}), de acordo com a equação 4, e comparou-se com o valor tabelado (F_{crit}) da distribuição F de *Snedecor* ($N-1;N-1;\alpha$) (124).

Equação 4:
$$F_{cal} = \frac{DS^2}{S_{y2}^2}$$

Como critério de decisão estabeleceu-se que:

- se $F_{\text{cal}} \leq F_{\text{crit}}$ as diferenças entre as variâncias não são estatisticamente significativas e consequentemente a função de calibração é linear;
- se $F_{\text{cal}} > F_{\text{crit}}$ as diferenças entre as variâncias são estatisticamente significativas e consequentemente a função de calibração não é linear.

10.4.1 Gama de trabalho

A gama de trabalho corresponde à definição do intervalo entre o valor de concentração mínimo e máximo esperadas para o analito em estudo, de modo a evitar extrapolações (134). Estudada em simultâneo com a linearidade, a avaliação da gama de trabalho foi realizada para um modelo de calibração linear.

Assim, selecionaram-se, adicionalmente, duas concentrações representativas dos extremos, mínimo e máximo, do intervalo de concentrações selecionados para o estudo da linearidade. Foram analisadas cinco alíquotas (1 g) de fígado branco para cada uma dessas concentrações, às quais foi adicionado PI (25 ng/g). Estas alíquotas foram analisadas em conjunto com as amostras de calibração efetuadas para o estudo da linearidade de acordo com o método desenvolvido.

A existência de diferenças estatisticamente significativas entre os valores das variâncias nos limites da gama de trabalho foi verificada recorrendo ao teste de homogeneidade de variâncias (124,144). Para isso, calculou-se, segundo a equação 5, as variâncias associadas ao primeiro e ao último calibrador, S_1^2 e S_9^2 , respetivamente (124,143,144).

Equação 5:

$$S_i^2 = \frac{\sum_{j=1}^n (y_{ij} - \bar{y}_i)^2}{n_i - 1}$$

Onde,

i representa o ponto de calibração ($i=1,2,\dots$)

j representa o número de réplicas efetuadas para cada amostra de calibração;

n representa o número de resultados obtidos;

y_i representa o resultado obtido;

\bar{y}_i representa a média dos resultados obtidos.

Tabela 10. Gama de trabalho e calibradores utilizados para cada um dos analitos em estudo.

Analito	Gama de trabalho	Nº calibradores
Amitriptilina	25, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 ng/g	8
Ciamemazina	9, 15, 30, 60, 120, 240, 360, 480, 600 ng/g	9
Citalopram	15, 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 ng/g	9
Clomipramina	15, 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 ng/g	9
Clozapina	9, 15, 30, 60, 120, 240, 360, 480, 600 ng/g	9
Fluoxetina	90, 150, 300, 600, 1200, 2400, 3600, 4800, 6000 ng/g	9
Haloperidol	36, 60, 120, 240, 480, 960, 1440, 1920, 2400 ng/g	9
Levomepromazina	25, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 ng/g	8
Mirtazapina	36, 60, 120, 240, 480, 960, 1440, 1920, 2400 ng/g	9
Sertralina	36, 60, 120, 240, 480, 960, 1440, 1920, 2400 ng/g	9
Tiapride	180, 300, 600, 1200, 2400, 4800, 7200, 9600, 12000 ng/g	9
Ticlopidina	36, 60, 120, 240, 480, 960, 1440, 1920, 2400 ng/g	9
Tramadol	15, 25, 50, 100, 200, 400, 600, 800, 1000 ng/g	9
Trazodona	30, 60, 120, 240, 360, 480, 600 ng/g	7
Venlafaxina	36, 60, 120, 240, 480, 960, 1440, 1920, 2400 ng/g	9

Já as equações 6 e 7 permitiram o cálculo do valor teste (PG) (124,144).

Equação 6: $PG = \frac{S_9^2}{S_1^2}, \text{ se } S_9^2 > S_1^2$

Equação 7: $PG = \frac{S_1^2}{S_9^2}, \text{ se } S_9^2 < S_1^2$

Para cada analito em estudo, o valor de PG foi comparado com o valor tabelado da distribuição F de *Snedecor* (F_{crit}) para (N-1;N-1) graus de liberdade e para um nível de confiança de 95% ($\alpha = 0,05$), sendo estabelecido como critério de decisão que quando $PG \leq F_{\text{crit}}$ as diferenças de variância não são consideradas estatisticamente significativas e a gama de trabalho está bem ajustada, já quando se verifica o contrário as diferenças entre as variâncias são estatisticamente significativas e, por sua vez, a gama de trabalho não está bem ajustada (124,143,144).

10.4.2 Regressão linear ponderada

No estudo da linearidade assume-se a homogeneidade das variâncias, isto é, o desvio-padrão do erro para a variável dependente é constante ao longo da gama de

trabalho. Contudo, nem sempre se verifica esta premissa, havendo uma heterocedasticidade das variâncias. Nestes casos recorre-se ao método dos mínimos quadrados ponderados para harmonizar as discrepâncias entre as variâncias dos diferentes pontos de calibração (145).

Utiliza-se então a regressão linear ponderada (do inglês, *weighted least squares linear regression* ou *WLSLR*), em detrimento da regressão linear simples (RLS). No método dos mínimos quadrados ponderados recorre-se à minimização dos resíduos após ponderação, a qual é representada pela equação 8 (143,145).

Equação 8:
$$SS = \sum \frac{(y_{\text{observado},i} - y_{\text{previsto},i})}{\sigma_i^2}$$

Onde,

σ_i^2 representa a variância de Y.

Assim, para harmonizar as discrepâncias entre as variâncias dos diferentes pontos de calibração recorreu-se ao estudo de fatores de ponderação empíricos, como aproximação simplista da variância, baseados na variável independente (x) ou dependente (y): $\frac{1}{x}; \frac{1}{x^2}; \frac{1}{\sqrt{x}}; \frac{1}{y}; \frac{1}{y^2}; \frac{1}{\sqrt{y}}$ (135,143,145).

A escolha do fator de ponderação empírico mais adequado foi baseada na determinação do erro relativo percentual (ER%) – equação 9, no cálculo do somatório do erro relativo percentual ($\sum ER\%$) e na representação gráfica do ER% em função da concentração, sendo que neste último caso, os valores de ER% devem estar distribuídos de uma forma aleatória e dispostos paralelamente (sob a forma de faixa horizontal) em função da concentração. O fator de ponderação mais adequado foi aquele que originou a faixa horizontal mais estreita e o menor valor de $\sum ER\%$ (143).

Equação 9:
$$ER\% = \frac{C_{\text{est}} - C_{\text{amo}}}{C_{\text{amo}}} \times 100$$

Onde,

C_{est} representa a concentração estimada na amostra;

C_{amo} representa a concentração real na amostra.

Para este estudo prepararam-se quinze curvas de calibração, uma por analito, por fortificação de alíquotas (1 g) de uma *pool* de fígados brancos. Os pontos de calibração encontram-se distribuídos ao longo da gama de trabalho. A cada um destes foi adicionado o PI a 25 ng/g e procedeu-se à execução da metodologia desenvolvida. Este procedimento foi repetido durante cinco dias (num total de 75 curvas de calibração).

10.5 Limite de Detecção (LOD)

LOD é definido como sendo a menor concentração de analito que o método analítico tem capacidade de diferenciar do ruído, isto é, é a menor quantidade de analito presente numa amostra que pode ser detetada, mas não necessariamente quantificada (129,134,146).

Existem várias metodologias para a determinação deste parâmetro: o método visual, o método baseado nos resultados da curva analítica ou do branco fortificado ou o método baseado na razão S/N. Neste trabalho utilizou-se a metodologia baseada na razão S/N (133,134,140,146). Esta metodologia só é aplicada a métodos analíticos em que é possível observar ruído de linha de base, como é o caso dos métodos cromatográficos e é realizada por comparação do sinal medido do analito na amostra, com uma concentração conhecida na gama baixa, com o ruído da linha de base em volta do pico cromatográfico. Uma razão S/N igual ou superior a 3 é considerada aceitável e estabelece a concentração mínima a que o analito pode ser detetado (133,134,140,146).

Em termos laboratoriais foram preparados cinco replicados de uma alíquota de fígado branco fortificados com os analitos em estudo com concentrações esperadas como LOD. Simultaneamente preparou-se um controlo negativo, que consiste numa alíquota de fígado branco à qual não se adiciona os analitos em estudo. Adicionou-se o PI a 500 ng/g a todos os replicados e ao controlo negativo. Aplicou-se o procedimento extrativo e analítico a todos os replicados e ao controlo negativo e calculou-se a razão S/N em cada um dos replicados. Comparou-se os cromatogramas obtidos para os replicados com o obtido para o controlo negativo e verificou-se se era possível em todos os replicados distinguir os analitos nos replicados do controlo negativo. Para além disto, verificou-se o cumprimento dos critérios de identificação. Quando a razão S/N foi superior a 3, efetuaram-se diluições sucessivas até obter uma razão S/N de 3 ou próxima de 3. Desta forma, o LOD correspondeu à concentração inferior a que todos os replicados originaram valores de razão S/N superiores ou iguais a 3 e em que os analitos foram inequivocamente identificados.

10.6 Limite de Quantificação (LOQ)

LOQ refere-se à menor quantidade de analito numa amostra que é possível medir com adequada precisão e exatidão (124,128,130,133,134,140).

Como referido para o LOD existem diferentes metodologias para a determinação do LOQ: o método da razão S/N que consiste em comparar o sinal analítico obtido para um analito em concentrações baixas presente numa amostra com o ruído da linha de base em volta do pico cromatográfico, sendo que uma razão S/N igual ou superior a 10 é considerada aceitável e estabelece o LOQ ou o método baseado em dados estatísticos da curva analítica ou do branco fortificado (124,133,134,140).

Existe ainda outra metodologia para determinar o LOQ que se baseia nos valores de precisão e de exatidão ($< 20\%$ e $\pm 20\%$, respetivamente), que se mostra mais prática e de acordo com a própria definição de LOQ (129,133,147). Esta metodologia foi a escolhida neste trabalho, uma vez que apresenta a vantagem da determinação do LOQ ser baseada no mesmo procedimento de quantificação utilizado para as amostras reais (133).

O estudo do LOQ foi realizado em conjunto com o estudo da linearidade. Efetuaram-se quinze curvas de calibração, uma por composto, por fortificação de alíquotas de fígado branco (7 a 9 calibradores) e adicionou-se 25 ng/g de PI a todas as amostras, procedendo-se ao processo extrativo. O LOQ correspondeu à concentração do calibrador mais baixo (cinco replicados), no qual foi possível identificar a presença do analito, através da confirmação dos critérios de identificação e da verificação do cumprimento dos critérios de precisão e de exatidão, que devem ser $< 20\%$ e $\pm 20\%$, respetivamente.

10.7 Eficiência da Extração (Recuperação)

Recuperação é entendida como a resposta do detetor a uma quantidade de analito adicionada e extraída da matriz comparada à resposta do detetor obtida da concentração real do analito (sem extração), ou seja, corresponde à eficiência da extração de um método analítico (129).

A recuperação (Rec) é calculada segundo a equação 10:

Equação 10
$$\text{Rec}(\%) = \left(\frac{\text{Arel com extracção}}{\text{Arel sem extracção}} \right) \times 100$$

Em que,

$A_{rel \text{ com extracção}}$ = razão das áreas dos picos cromatográficos (analito/PI) das alíquotas fortificadas antes da extração;

$A_{rel \text{ sem extracção}}$ = razão das áreas dos picos cromatográficos (analito/PI) das alíquotas fortificadas após a extração.

A determinação da eficiência da extração do método analítico em validação consistiu em seleccionar três gamas de trabalho, uma gama baixa, média e alta, para as quais foram preparados dois conjuntos de triplicados de alíquotas de fígado branco, isento dos analitos em estudo, para cada gama de trabalho. Um dos conjuntos foi fortificado com os analitos de interesse antes do processo extrativo, enquanto que o outro conjunto foi fortificado após o término do processo extrativo, antes da etapa de concentração. O PI foi adicionado a todas as alíquotas após o processo extrativo, antes da etapa de concentração a 500 ng/g.

10.8 Precisão: Repetibilidade e Precisão Intermédia

Precisão é designada como sendo a avaliação da dispersão dos resultados analíticos obtidos em ensaios independentes, repetidos sobre uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas, contudo o estudo deve ser preferencialmente realizado em amostras de forma a minimizar os efeitos de matriz, ausente aquando da utilização de padrões. Ou seja, a precisão fornece a dispersão dos valores medidos em torno do valor médio. Em suma, é a medida do erro aleatório. É determinada pelo desvio padrão relativo (também designado de CV, coeficiente de variação, ou de RSD, do inglês *Relative Standard Precision*) (124,128,129,133,146).

Esta dispersão pode ser avaliada por três medidas: repetibilidade, reprodutibilidade e uma entre estas duas medidas extremas de precisão designada por precisão intermédia (SI) (124,128,129,133,146).

A repetibilidade (ou precisão intra-corrida ou intra-ensaio) consiste na precisão de um método efetuado em condições idênticas, sem variar nenhum fator que possa afetar a análise, isto é, numa mesma amostra, no mesmo laboratório, pelo mesmo analista, no mesmo equipamento, com os mesmos reagentes e num curto intervalo de tempo (e.g. no mesmo dia) (124,133,134).

Reprodutibilidade (ou precisão inter-laboratorial) é o grau de concordância dos resultados obtidos para medições efetuadas numa mesma amostra e pelo mesmo método de

ensaio, mas em diferentes condições (diferente laboratório, analista, equipamento, entre outros). Refere-se a resultados de estudos entre laboratórios diferentes (124,129,133,134). A reprodutibilidade só deve ser avaliada em casos de padronização do método, quando um método vai ser aplicado em diferentes laboratórios (129,133). Por isto, neste trabalho não se efetuou a validação da reprodutibilidade.

A precisão intermédia (ou precisão inter-corrida ou variabilidade intra-laboratorial) refere-se à precisão avaliada numa mesma amostra, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório, mas com variação das condições de análise (uma ou mais), como o analista, o equipamento, o intervalo de tempo (dias diferentes), entre outros (124,133,134,146,148). Esta medida de precisão é a mais representativa da variabilidade dos resultados num laboratório e, como tal, a mais aconselhável a adotar (124,134).

A metodologia adotada neste trabalho para a validação da precisão (repetibilidade e precisão intermédia) envolveu a aplicação do método analítico desenvolvido a uma *pool* de fígados brancos fortificada em p sequências analíticas diferentes. Em cada sequência a amostra foi extraída e analisada n vezes em condições de repetibilidade, mas entre sequências foram variadas as condições de análise mais relevantes, avaliando a sua influência sobre os resultados obtidos. Normalmente a precisão altera-se com diferentes gamas de concentração e, por isso, foi estudada para diferentes gamas de concentração representativas da gama de trabalho (124,133,146).

Realizaram-se quinze curvas de calibração, uma por analito, com um número de calibradores entre 7 e 9, por fortificação de alíquotas de uma *pool* de fígado branco. Utilizou-se 1 g de amostra e os calibradores encontram-se distribuídos na gama de trabalho de cada analito (foram preparados 5 replicados de 5 concentrações diferentes, exceto para a trazodona (apenas 3) e para a amitriptilina e a levomepromazina (apenas 4), para a determinação da repetibilidade do método). Conjuntamente, foram preparadas três alíquotas a três níveis de concentração (tabela 11) que caracterizam a gama de trabalho, na gama baixa, média e alta. Estas alíquotas foram preparadas em triplicado por fortificação de uma alíquota de uma *pool* de fígados brancos. Estas três alíquotas são designadas de amostras controlo e serão utilizadas para a determinação da precisão intermédia. A todas as alíquotas, de calibração e controlos, foi adicionado PI a 25 ng/g. Todas as alíquotas foram extraídas e analisadas adotando o procedimento extrativo desenvolvido e as condições experimentais utilizadas na validação do método desenvolvido, em condições de repetibilidade tão estáveis quanto possível, ou seja, extraídas e analisadas no mesmo período de tempo, pelo mesmo operador, no mesmo laboratório, utilizando os mesmos

reagentes e o mesmo equipamento e analisadas independentemente. O procedimento experimental foi repetido em dias diferentes (5 dias, $n=5$), durante um período de dois meses. Segundo Maroto *et al.* (149) devem ser, aquando do estudo da precisão intermédia, incorporadas as causas de variabilidade que simulam as condições operacionais comuns no laboratório e, por isso, neste trabalho foram variadas condições entre sequências analíticas (entre dias): reagentes de lotes diferentes, diferentes soluções de reagentes, diferentes lotes de kits de extração QuEChERS e diferentes curvas de calibração.

Recorreu-se à regressão linear pelo método dos mínimos quadrados ponderados para obter as curvas de calibração e, com base nestas, estimaram-se os valores de concentração por interpolação da área cromatográfica relativa (razão entre a área do pico cromatográfico do analito e a área cromatográfica do pico do PI) na equação de regressão linear ponderada.

Para cada analito em estudo, nos diversos níveis de concentração, as estimativas da variância de repetibilidade (S_R^2) e precisão intermédia (S_I^2) foram determinadas por uma análise de variância (ANOVA), estando representadas nas tabelas 12 e 13 as equações necessárias para a sua determinação (124,149,150).

A repetibilidade do método analítico, para cada gama de concentração estudada, foi estimada através do cálculo do coeficiente de variação de repetibilidade (CV_R), expresso em percentagem e definido como a razão do desvio-padrão de repetibilidade (S_R) em relação ao valor médio (\bar{X}) – equação 11. A precisão intermédia foi determinada pelo cálculo do coeficiente da variação da precisão intermédia (CV_{SI}), expresso em percentagem e dado pela razão entre o desvio-padrão da precisão intermédia (S_I) e a média dos resultados obtidos (\bar{X}) – equação 12 (124).

Equação 11:
$$CV_R = \frac{S_R}{\bar{X}} \times 100$$

Equação 12:
$$CV_{SI} = \frac{S_I}{\bar{X}} \times 100$$

Tabela 11. Concentrações (gamas baixa, média e alta) dos controlos utilizados no estudo da precisão e da exatidão.

Medicamento	Concentração Controlos (ng/g)	
Ciamemazina Clozapina Trazodona	Baixa	150
	Média	300
	Alta	450
Amitriptilina Levomepromazina Citalopram Clomipramina Tramadol	Baixa	250
	Média	500
	Alta	750
Haloperidol Mirtazapina Sertralina Venlafaxina Ticlopidina	Baixa	600
	Média	1200
	Alta	1800
Fluoxetina	Baixa	1500
	Média	3000
	Alta	4500
Tiapride	Baixa	3000
	Média	6000
	Alta	9000

Tabela 12. Análise de variância: tabela ANOVA. (124,149,150)

Fonte de variação	Soma dos Quadrados (SS)	Graus de liberdade (g.l.)	Quadrados médios (MS)
Inter grupos (run)	$SS_{run} = n \sum_{i=1}^p (\bar{X}_i - \bar{\bar{X}})^2$	p-1	$MS_{run} = \frac{n \sum_{i=1}^p (\bar{X}_i - \bar{\bar{X}})^2}{p - 1}$
Intra grupos (residual)	$SS_r = \sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (X_{ij} - \bar{x}_i)^2$	p(n-1)	$MS_r = \frac{\sum_{i=1}^p \sum_{j=1}^n (X_{ij} - \bar{x}_i)^2}{p(n - 1)}$
Total	SS_t	pn-1	$MS_t = \frac{SS_t}{n - 1}$

Tabela 13. Cálculo das estimativas das variâncias para o modelo experimental utilizado no estudo da repetibilidades e da precisão intermédia. (124,149,150)

Variância	Expressão	Graus de liberdade (g.l.)
Variância da repetibilidade (S_R^2)	$S_R^2 = MS_r$	p(n-1)
Variância <i>Between-run</i> (S_{run}^2)	$S_{run}^2 = \frac{MS_{run} - MS_r}{n}$	p(n-1)
Variância da Precisão intermédia (S_I^2)	$S_I^2 = (S_r^2) + (S_{run}^2)$	p(n-1)
Variância da média (S_x^2)	$S_x^2 = \frac{MS_{run}}{n}$	p-1

Onde,

p = número de sequências analíticas (*run*) na qual a amostra é analisada;

n = número de replicados efetuados em cada sequência analítica;

X_{ij} = resultado individual, de uma amostra, analisado no j -ésimo replicado e na i -ésima sequência;

\bar{X}_i = média de j replicados obtidos na sequência i ;

$\bar{\bar{X}}$ = grande média, calculada como a média das médias dos resultados obtidos em p sequências diferentes.

10.9 Exatidão

Exatidão (do inglês *accuracy*) de um método analítico combina componentes de erros sistemáticos (*bias*) e de erros aleatórios (precisão). No entanto, a exatidão é comumente descrita apenas pelos componentes do erro sistemático, sendo, por isso, utilizada a definição *bias* (124,133).

Exatidão, por vezes designada por veracidade (do inglês *trueness*), é o grau de concordância entre a média dos resultados obtidos na aplicação de um determinado método de ensaio e o valor de referência aceite como verdadeiro, podendo ser medida pela percentagem do desvio do valor medido em relação ao valor aceite com referência (128,130,133,134,151). Deste modo, *bias* é, de acordo com a Eurachem (12), “a diferença

entre a melhor estimativa dos resultados (expectativa) do ensaio e o valor aceite como referência”. A sua estimativa pode ser feita recorrendo a ensaios com materiais de referência certificados, participação em ensaios interlaboratoriais, testes comparativos entre o método analítico desenvolvido e um método de referência ou um método normalizado e mediante amostras fortificadas (124).

Não havendo materiais de referência certificados disponíveis, a impossibilidade de participar em ensaios interlaboratoriais ou a inexistência de um método de referência, avaliou-se a exatidão através da recuperação absoluta (razão entre o valor observado e o valor esperado) obtida a partir da fortificação de amostras de fígado branco com uma quantidade conhecida dos analitos em estudo (150). Esta metodologia pode apresentar a desvantagem de que a estimativa da recuperação obtida em amostras fortificadas pode ser distinta da que seria obtida se o analito estivesse presente na amostra de forma nativa.

Experimentalmente, o estudo deste parâmetro foi realizado de acordo com o descrito para a precisão intermédia. A exatidão foi expressa, em percentagem, como o erro médio relativo da concentração estimada (EMR) para cada nível de concentração (equação 13) (143,146). Utilizaram-se 3 gamas de concentração e cada uma delas em triplicado (mínimo de 9 determinações no intervalo da gama de trabalho) (146). O valor médio de exatidão (desvio da média em relação ao valor aceite como referência) deve ser inferior a 20% do esperado como valor de referência para o LOQ e deve ser inferior a 15% para os restantes valores de concentração (129,150).

Equação 13:
$$EMR = \frac{(\text{média das concentrações estimadas} - \text{valor teórico})}{\text{valor teórico}} \times 100$$

10.10 Arrastamento (do inglês *Carryover*)

O fenómeno de arrastamento é um grave problema que pode condicionar a precisão e a exatidão de um método por GC-MS, bem como originar um falso resultado positivo, situação muito grave num contexto de toxicologia forense e que, por isso, deve ser verificada aquando do desenvolvimento de um método. O arrastamento é definido como um aumento de concentração de um analito numa amostra, proveniente de vestígios de amostras analisadas anteriormente, presentes normalmente na seringa, no injetor, no *liner*, na coluna cromatográfica e/ou no detetor. Este fenómeno pode não se verificar apenas na amostra seguinte na sequência analítica, mas afetar várias amostras na sequência (152).

Tendo em conta o referido, o fenómeno de arrastamento foi avaliado em simultâneo com o estudo da linearidade e da gama de trabalho e consistiu em preparar uma alíquota de *pool* de fígados isenta dos analitos em estudo (amostra branca), que foi extraída e analisada nas mesmas condições analíticas. Na sequência analítica a amostra branca foi injetada em duplicado após a análise das amostras correspondentes à gama alta de concentração (450, 750, 1800, 4500 e 9000 ng/g) e averiguou-se a presença de arrastamento.

10.11 Robustez

Robustez é entendida como a medição da suscetibilidade do método a pequenas alterações (variação de valores de pH, temperatura, entre outros) que podem ocorrer durante a análise de rotina sem que os resultados sejam afetados por essas variações, sendo que um método é robusto quando não é afetado por pequenas e deliberadas modificações aos seus parâmetros, fornecendo confiança ao método durante as análise de rotina (124,130,133,134,146).

Uma validação completa não tem necessariamente de incluir a avaliação da robustez, no entanto, é importante o seu estudo durante o desenvolvimento de um método analítico, já que permite a deteção de problemas que possam ocorrer durante e após a sua validação (133).

Estudou-se este parâmetro, em condições de precisão intermédia, aquando do estudo da precisão e da exatidão, segundo a Relacre (124).

III. Resultados e Discussão

1. Estratégia de otimização do método

1.1 Extração em Fase Única

1.1.1 Tipo de solvente de extração

Tendo em conta o referido anteriormente em termos da utilização de diferentes solventes orgânicos para extração por QuEChERS, procedeu-se à otimização do solvente orgânico mais adequado para a extração dos analitos em estudo. Foram estudados dois solventes, o acetonitrilo (acn) e o acetato de etilo (ac etilo), de acordo com Matsuta *et al.* (93).

Para ambos foram utilizadas as mesmas condições de preparação e extração, e foram realizadas seis réplicas.

Concluiu-se que o solvente orgânico mais adequado para a extração dos medicamentos é o acetonitrilo, visto a sua maior eficiência na extração de todos os analitos (Gráficos 1.1.1-A e 1.1.1-B).

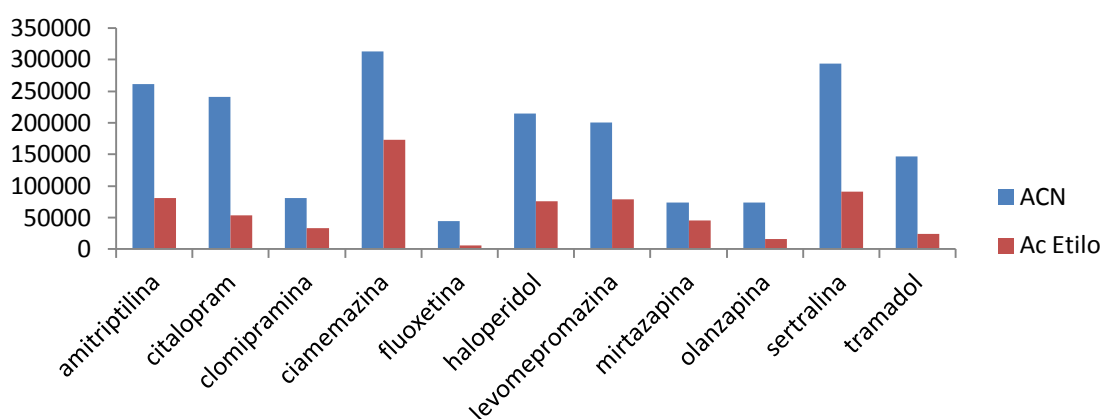


Gráfico 1.1.1-A. Áreas dos picos cromatográficos dos iões de quantificação dos medicamentos em estudo para otimização do solvente de extração.

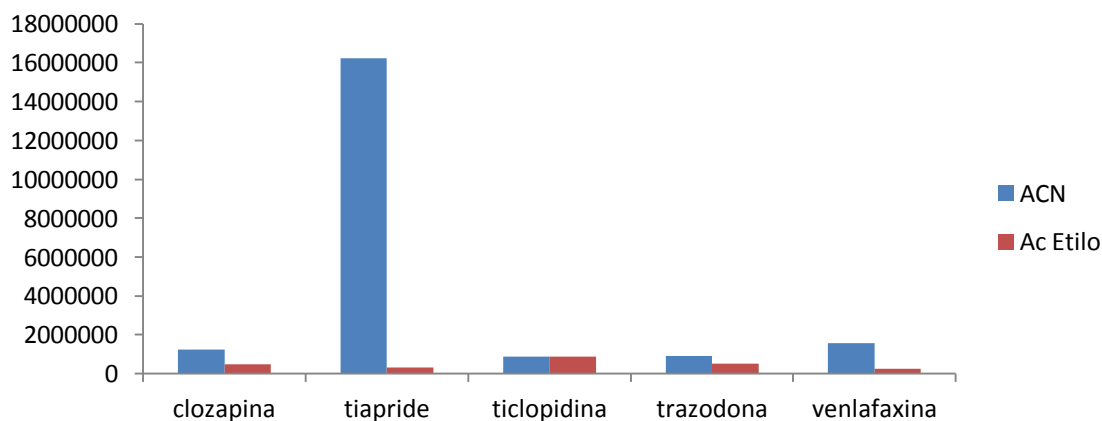


Gráfico 1.1.1-B. Áreas dos picos cromatográficos dos iões de quantificação dos medicamentos em estudo para otimização do solvente de extração.

III. Resultados e Discussão

1. Estratégia de otimização do método

1.1.2 Volume de solvente de extração

Em relação à otimização do volume de solvente de extração mais adequado para a extração dos analitos em estudo (já definido como sendo acetonitrilo), foram avaliados três níveis: 1, 1,5 ou 2 mL.

Para esses três níveis foram aplicadas as mesmas condições de preparação e extração e foram realizados triplicados.

O volume de solvente orgânico mais adequado para a extração dos medicamentos é 1,5 mL, já que todos os analitos apresentam melhores resultados em termos de áreas relativas dos picos cromatográficos (maior eficácia de extração) com este volume (Gráficos 1.1.2-A e 1.1.2-B).

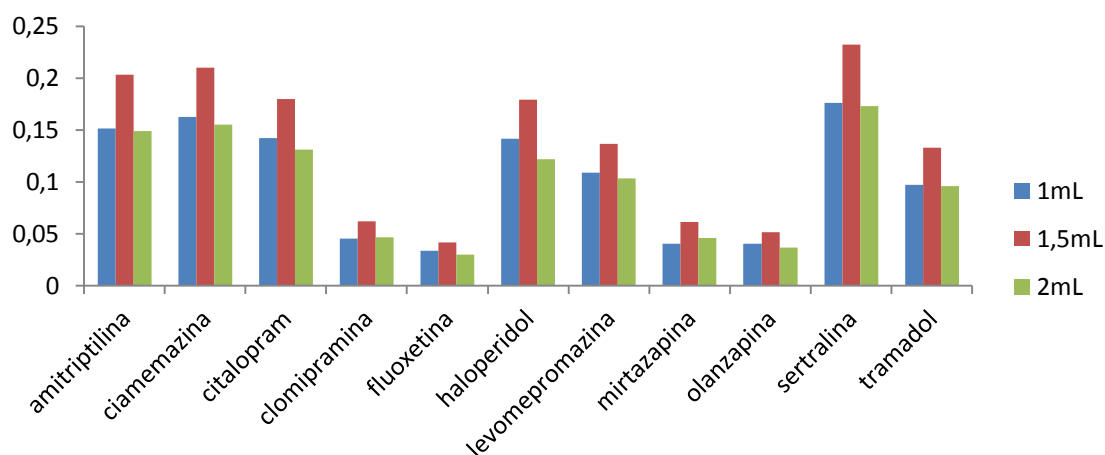


Gráfico 1.1.2-A. Razões entre as áreas dos picos cromatográficos dos íons de quantificação dos medicamentos em estudo e a área do pico cromatográfico do PI para a otimização do volume de solvente de extração.

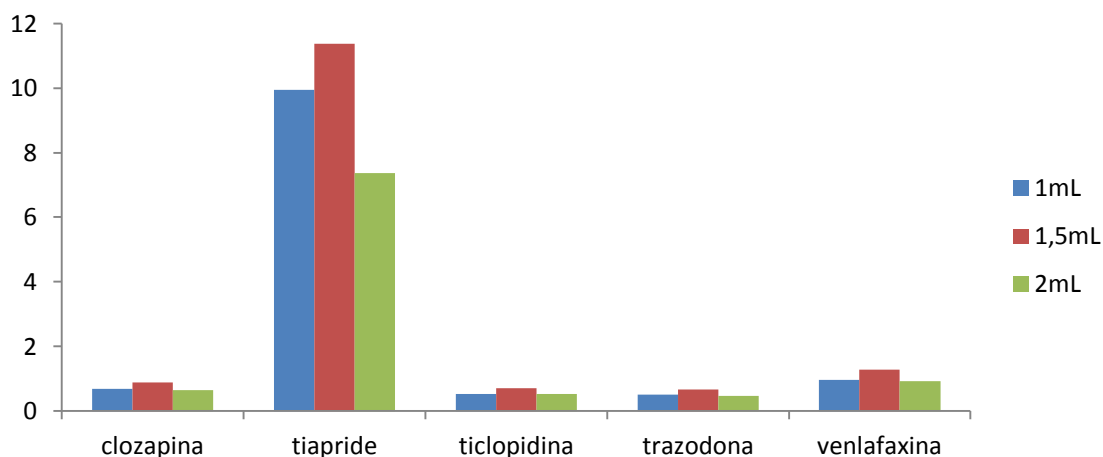


Gráfico 1.1.2-B. Razões entre as áreas dos picos cromatográficos dos íons de quantificação dos medicamentos em estudo e a área do pico cromatográfico do PI para otimização do volume de solvente de extração.

III. Resultados e Discussão

1. Estratégia de otimização do método

1.1.3 Percentagem de ácido acético no solvente de extração

A percentagem de ácido acético no solvente de extração foi também avaliada em três níveis: 0%, 0,1% ou 1%.

Para esses três níveis, realizados em triplicados, utilizou-se 1,5 mL de acetonitrilo e foram aplicadas as mesmas condições de preparação e extração.

Verificou-se que 1% de ácido acético no solvente de extração é mais adequado para a extração de medicamentos de amostras de fígado, exceto para a levomepromazina e para o tiapride, contudo como a diferença de resultados entre os três níveis para estes dois analitos é pouco significativa, assumiu-se o compromisso de utilizar esta percentagem de ácido acético no solvente de extração (Gráficos 1.1.3-A e 1.1.3-B). Este resultado é concordante com Stevens (153), que demonstrou que a extração de medicamentos de amostras de sangue é melhor com uma percentagem de ácido no solvente de extração. Uma das razões poderá ser atribuída ao facto do ácido acético em acetonitrilo quando combinado com o $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ prevenir que analitos básicos se degradem durante a extração (154).

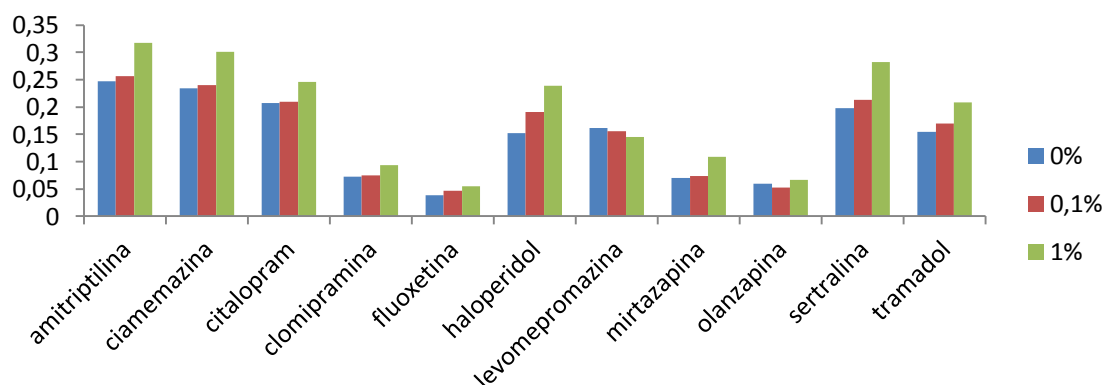


Gráfico 1.1.3-A. Razões entre as áreas dos picos cromatográficos dos iões de quantificação dos medicamentos em estudo e a área do pico cromatográfico do PI para otimização da percentagem de ácido no solvente de extração.

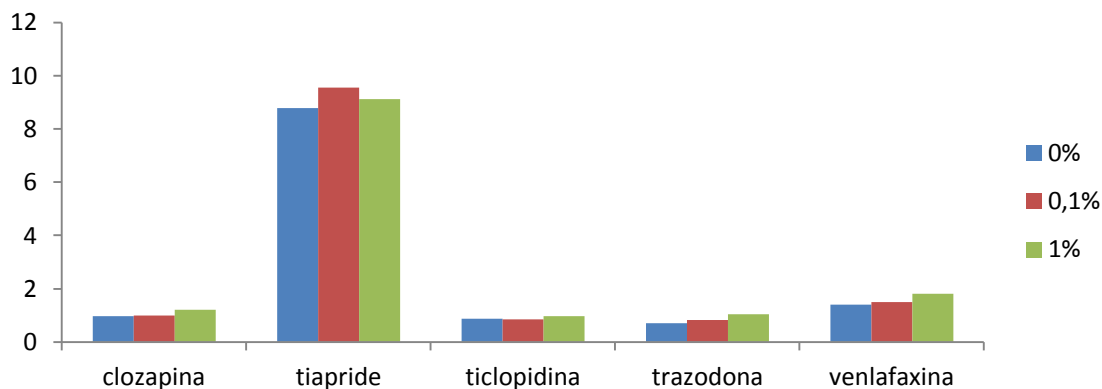


Gráfico 1.1.3-B. Razões entre as áreas dos picos cromatográficos dos iões de quantificação dos medicamentos em estudo e a área do pico cromatográfico do PI para otimização da percentagem de ácido no solvente de extração.

III. Resultados e Discussão

1. Estratégia de otimização do método

1.1.4 Quantidade de sais (MgSO_4 e $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ (4:1)) adicionada na Extração em Fase Única

A adição dos sais permite a separação das fases, sendo por isso essencial para a eficácia da extração em fase única. Assim, a quantidade de sais adicionada é um dos fatores a ser avaliado na otimização da extração por QuEChERS de medicamentos das amostras de fígado, tendo sido avaliados quatro níveis: 0,250 g; 0,500 g; 0,750 g ou 1,000 g.

Foram aplicadas as mesmas condições de preparação e de extração na avaliação dos quatro níveis realizados em triplicados.

Apesar da maioria dos analitos ter sido mais eficazmente extraída com uma menor quantidade de sais, alguns analitos como a sertralina e a fluoxetina com 0,250 g de sais eram drasticamente afetadas, não sendo eficazmente extraídos. Assim, estabeleceu-se que a quantidade de MgSO_4 e $\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ na proporção 4:1 mais vantajosa na extração é 0,500 g já que é o segundo nível que apresenta melhores resultados para a maioria dos analitos (Gráficos 1.1.4-A e 1.1.4-B).

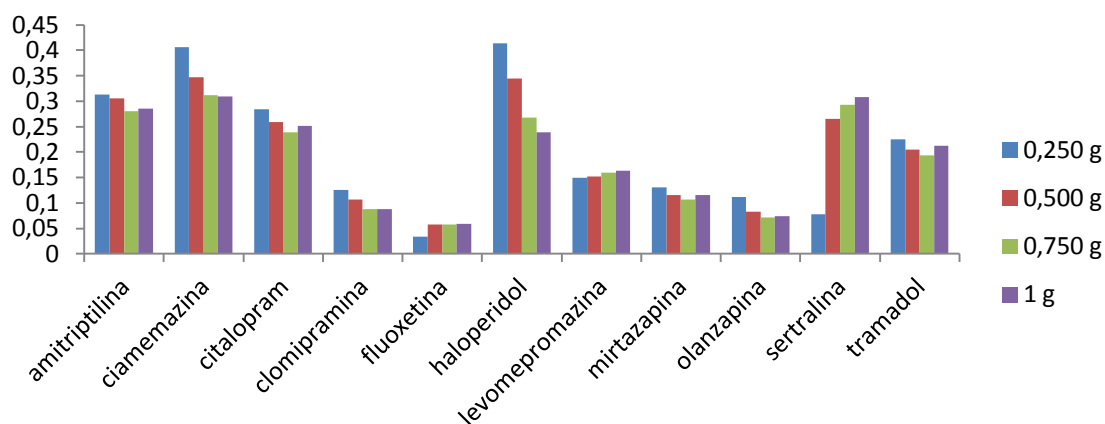


Gráfico 1.1.4-A. Razões entre as áreas dos picos cromatográficos dos iões de quantificação dos medicamentos em estudo e a área do pico cromatográfico do PI para otimização da quantidade de sais adicionada na Extração em Fase Única.

III. Resultados e Discussão

1. Estratégia de otimização do método

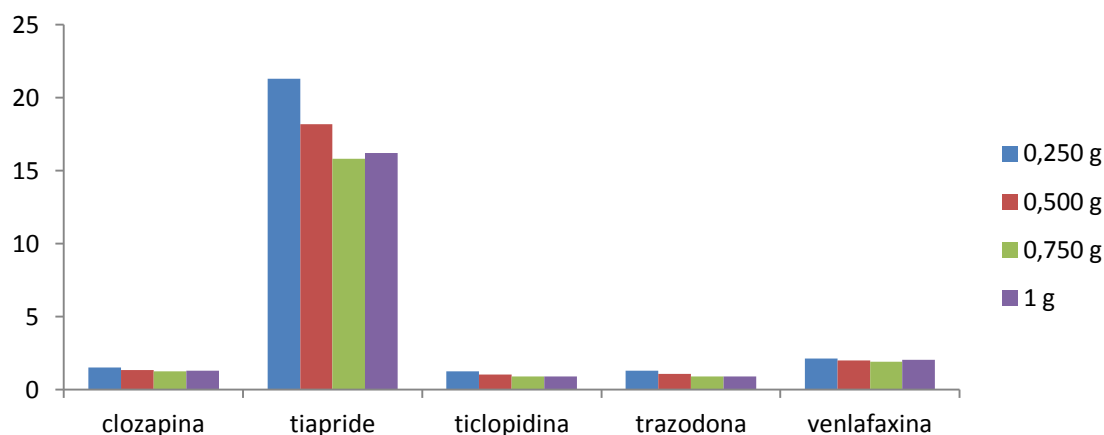


Gráfico 1.1.4-B. Razões entre as áreas dos picos cromatográficos dos iões de quantificação dos medicamentos em estudo e a área do pico cromatográfico do PI para otimização da quantidade de sais adicionada na Extração em Fase Única.

1.1.5 Tempo de agitação na Extração em Fase Única

O tempo de agitação na Extração em Fase Única foi avaliado na otimização do método em três níveis: 10, 30 ou 60 segundos.

Para esses três níveis foram aplicadas as mesmas condições de preparação e extração e foram realizados ensaios em triplicado.

Analisando os gráficos 1.1.5-A e 1.1.5-B conclui-se que o tempo que apresentou melhores resultados foi 10 segundos, o que acaba por ser vantajoso na medida em que torna o método mais rápido. É de referir que o tempo de 10 segundos não foi o que revelou melhores resultados para alguns dos analitos, como o tiapride, contudo definiu-se este tempo de agitação, já que a maioria dos analitos e aqueles que apresentam uma menor sensibilidade, por exemplo a olanzapina e a fluoxetina, apresentavam melhores resultados com este tempo de agitação.

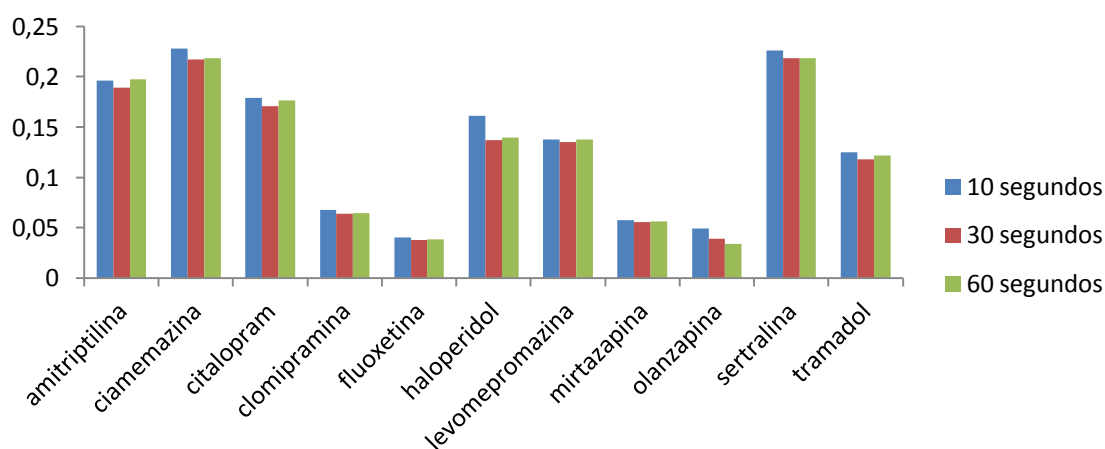


Gráfico 1.1.5-A. Razões entre as áreas dos picos cromatográficos dos iões de quantificação dos medicamentos em estudo e a área do pico cromatográfico do PI para otimização do tempo de agitação na Extração em Fase Única.

III. Resultados e Discussão

1. Estratégia de otimização do método

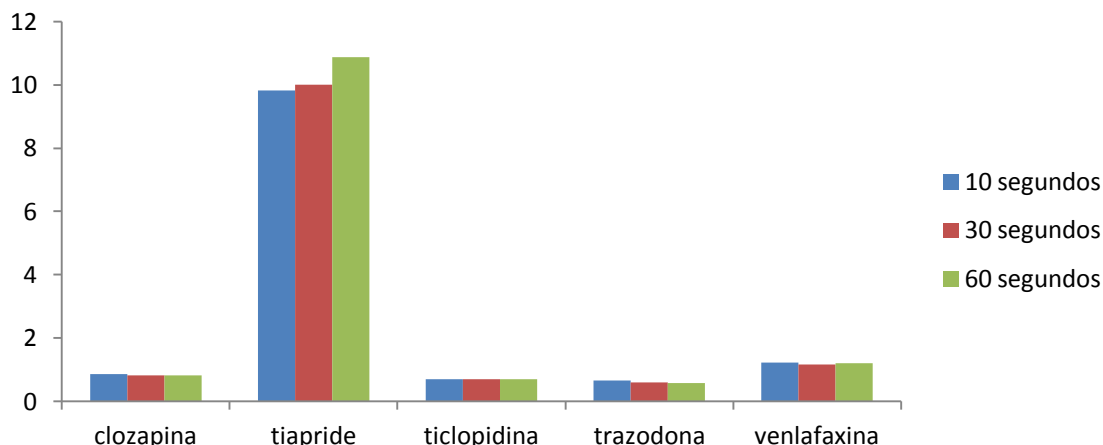


Gráfico 1.1.5-B. Razões entre as áreas dos picos cromatográficos dos iões de quantificação dos medicamentos em estudo e a área do pico cromatográfico do PI para otimização do tempo de agitação na Extração em Fase Única.

1.1.6 Tempo de centrifugação na Extração em Fase Única

Para o fator tempo de centrifugação na Extração em Fase Única estudaram-se três níveis: 2, 5 e 10 minutos.

Para esses níveis foram aplicadas as mesmas condições de preparação e extração e foram realizados triplicados.

No caso do tempo de centrifugação verificou-se que nem todos os medicamentos são afetados de igual forma pelos diferentes tempos de centrifugação, mas pelas mesmas razões referidas para a escolha do tempo de agitação na Extração em Fase Única, o tempo de centrifugação selecionado foi 2 minutos (Gráficos 1.1.6-A e 1.1.6-B).

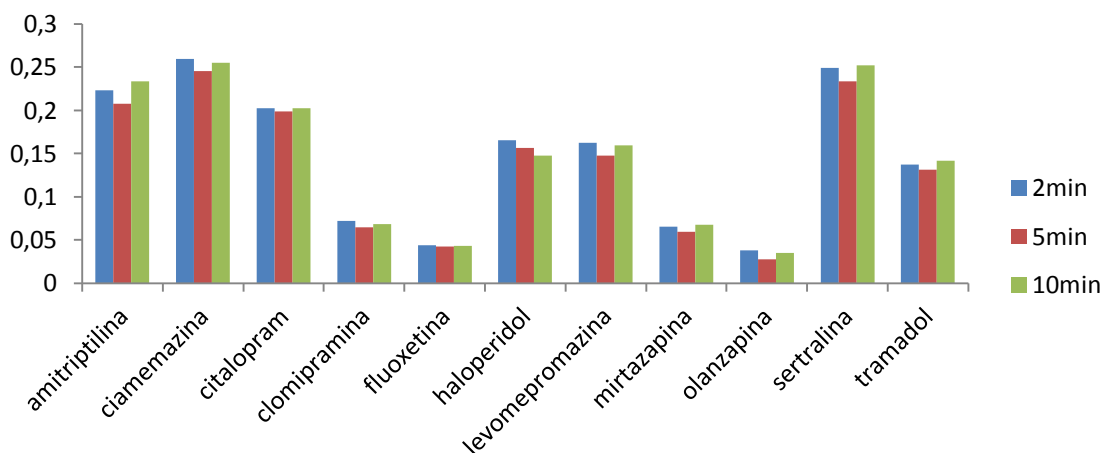


Gráfico 1.1.6-A. Razões entre as áreas dos picos cromatográficos dos iões de quantificação dos medicamentos em estudo e a área do pico cromatográfico do PI para otimização do tempo de centrifugação na Extração em Fase Única.

III. Resultados e Discussão

1. Estratégia de otimização do método



Gráfico 1.1.6-B. Razões entre as áreas dos picos cromatográficos dos iões de quantificação dos medicamentos em estudo e a área do pico cromatográfico do PI para otimização do tempo de centrifugação na Extração em Fase Única.

1.2 d-SPE

1.2.1 Composição de adsorventes utilizados na d-SPE

Relativamente à composição de adsorventes da d-SPE foram avaliados três níveis:

- 25 mg PSA, 25 mg C18EC e 150 mg MgSO_4 ;
- 25 mg C18 e 150 mg MgSO_4 ;
- 50 mg PSA, 50 mg C18, 7,5 mg GCB e 150 mg MgSO_4 .

Para esses três níveis foram aplicadas as mesmas condições de preparação e extração e foram realizados triplicados.

Através da análise dos gráficos 1.2.1-A e 1.2.1-B verifica-se que os adsorventes PSA, C18EC e MgSO_4 são os mais adequados para a extração de medicamentos de amostras de fígado. No entanto, apesar de apresentar melhores resultados apresenta grande variabilidade entre os resultados obtidos para os três replicados. Isto pode ser atribuído ao facto do ácido acético adicionado no solvente orgânico reagir com a PSA, fazendo com que a extração seja afetada negativamente (154). A composição PSA, C18, GCB e MgSO_4 foi também excluída devido a apresentar os piores resultados para todos os analitos à exceção da olanzapina e também porque os resultados obtidos apresentaram grande variabilidade entre os replicados, o que mostra que esta composição não é adequada para a extração destes analitos. Deste modo, definiu-se que a composição C18 e MgSO_4 é a mais indicada para a realização da extração, porque apesar de nenhum dos analitos apresentar melhores resultados para esta composição, esta é aquela que é mais reprodutível, isto é, naquela em que não se verifica grande variabilidade entre cada replicado.

III. Resultados e Discussão

1. Estratégia de otimização do método

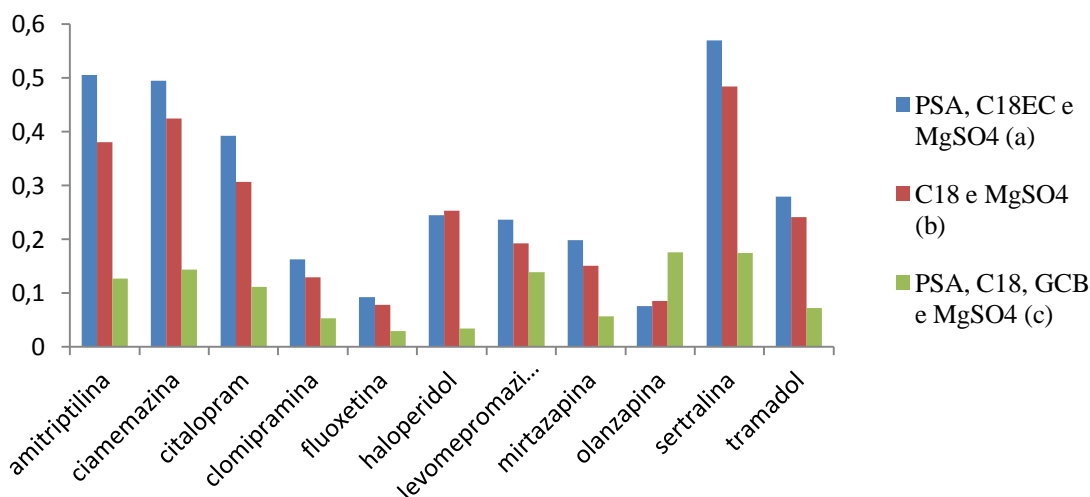


Gráfico 1.2.1-A. Razões entre as áreas dos picos cromatográficos dos iões de quantificação dos medicamentos em estudo e a área do pico cromatográfico do PI para otimização da composição de adsorventes utilizados na d-SPE.

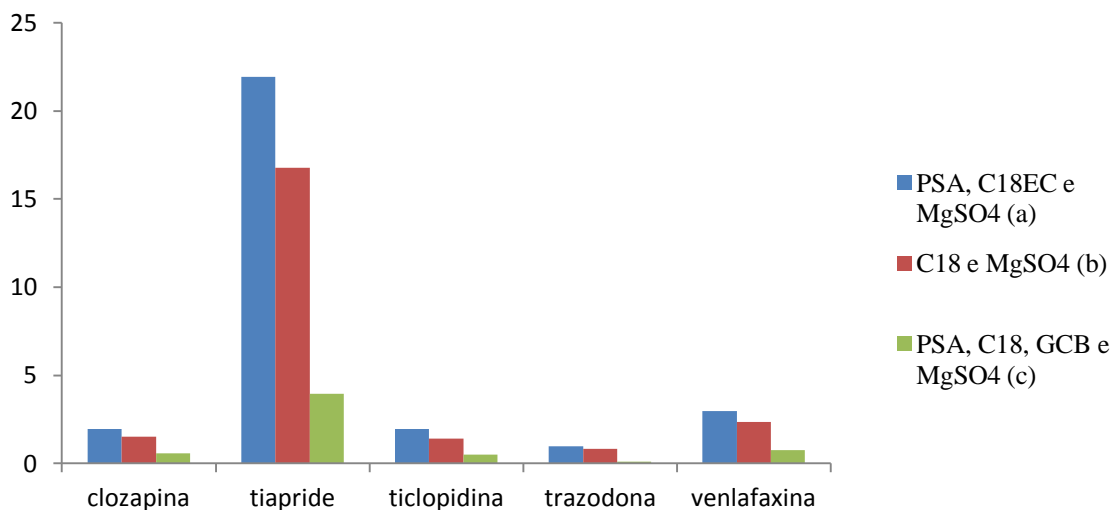


Gráfico 1.2.1-B. Razões entre as áreas dos picos cromatográficos dos iões de quantificação dos medicamentos em estudo e a área do pico cromatográfico do PI para otimização da composição de adsorventes utilizados na d-SPE.

1.2.2 Tempo de agitação na d-SPE

Na otimização do tempo de agitação na d-SPE avaliaram-se três níveis: 10, 20 ou 30 segundos.

Para esses três níveis foram aplicadas as mesmas condições de preparação e extração e foram realizados triplicados.

10 segundos de agitação mostraram-se suficientes para uma extração mais eficaz para a maioria dos analitos, exceto haloperidol e levomepromazina, que apresentam melhores resultados com 30 segundos de agitação, mas com uma diferença muito ligeira. Por isso, estabeleceu-se que os 10 segundos seriam mais adequados visto que permitiriam obter bons resultados para todos os analitos (gráficos 1.2.2-A e 1.2.2-B).

III. Resultados e Discussão

1. Estratégia de otimização do método

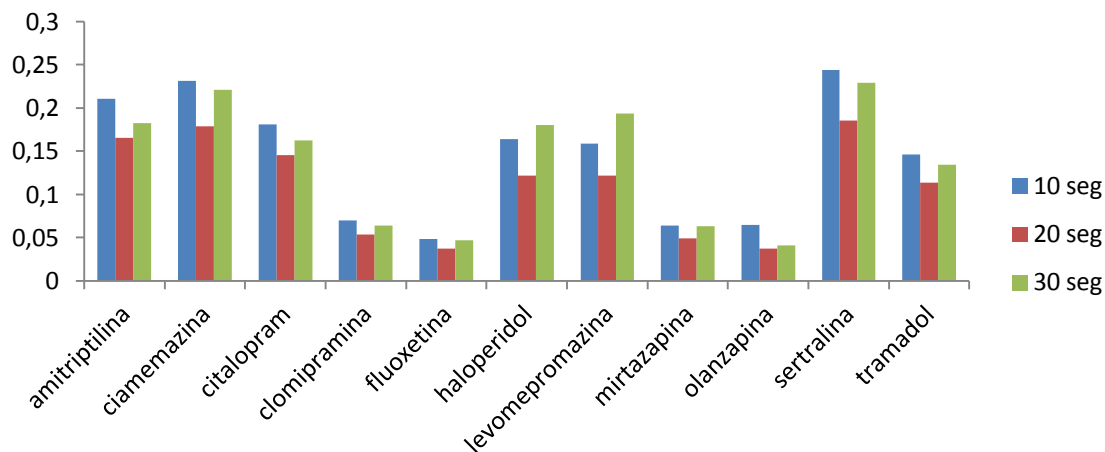


Gráfico 1.2.2-A. Razões entre as áreas dos picos cromatográficos dos iões de quantificação dos medicamentos em estudo e a área do pico cromatográfico do PI para otimização do tempo de agitação na d-SPE.

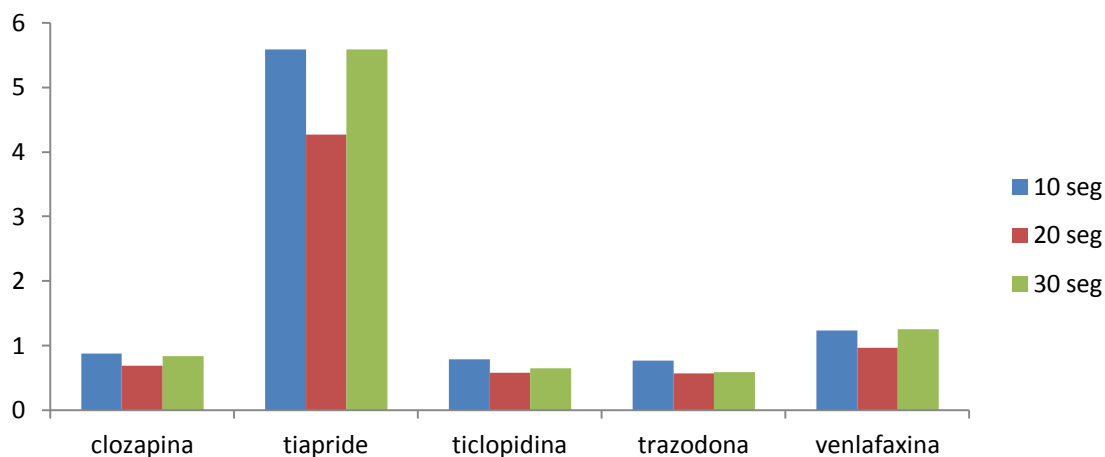


Gráfico 1.2.2-B. Razões entre as áreas dos picos cromatográficos dos iões de quantificação dos medicamentos em estudo e a área do pico cromatográfico do PI para otimização do tempo de agitação na d-SPE.

1.2.3 Tempo de centrifugação na d-SPE

1, 2 ou 3 minutos foram os níveis avaliados na otimização do tempo de centrifugação na d-SPE.

Para esses três níveis foram aplicadas as mesmas condições de preparação e extração e foram realizados triplicados.

O tempo de centrifugação adequado para uma melhor extração foi de 3 minutos para a maioria dos analitos (exceto haloperidol, olanzapina e tiapride), sendo por isso o tempo definido (gráficos 1.2.3-A e 1.2.3-B).

III. Resultados e Discussão

1. Estratégia de otimização do método

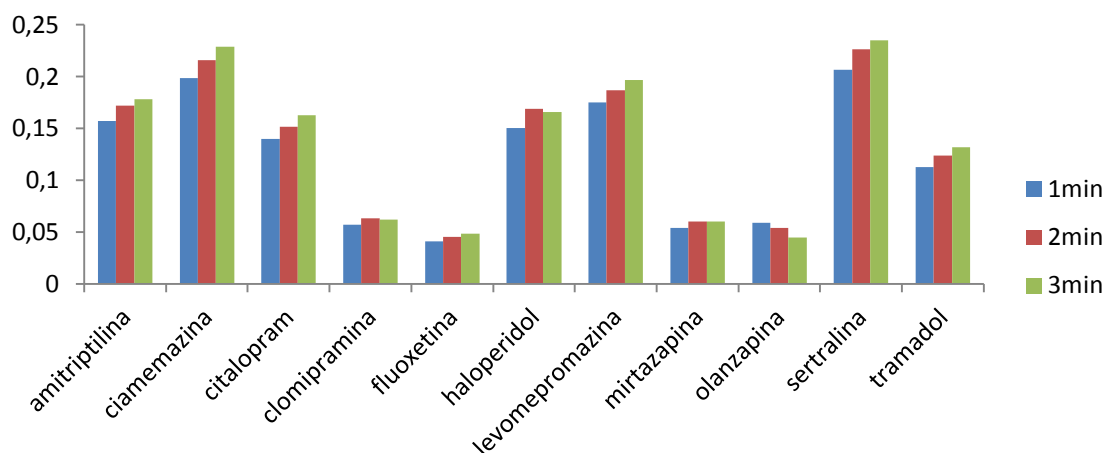


Gráfico 1.2.3-A. Razões entre as áreas dos picos cromatográficos dos iões de quantificação dos medicamentos em estudo e a área do pico cromatográfico do PI para otimização do tempo de centrifugação na d-SPE.

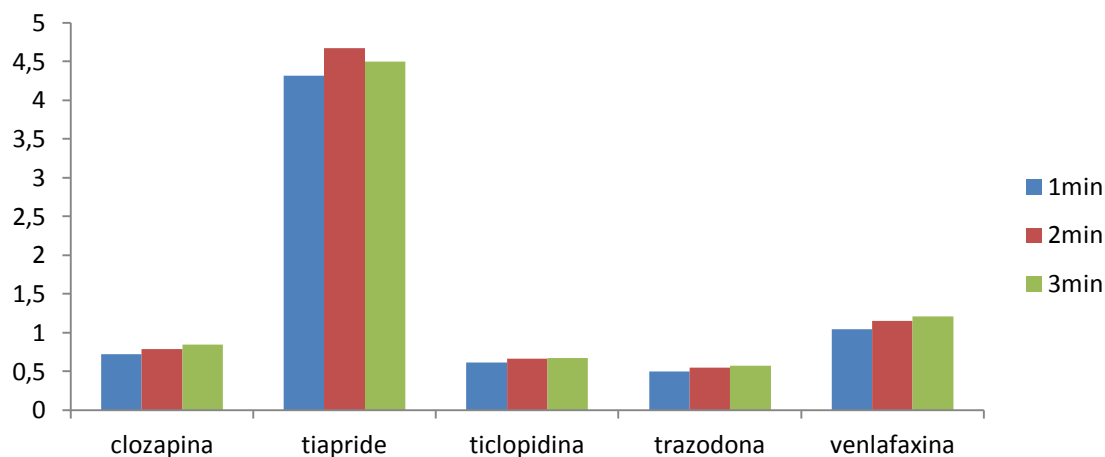


Gráfico 1.2.3-B. Razões entre as áreas dos picos cromatográficos dos iões de quantificação dos medicamentos em estudo e a área do pico cromatográfico do PI para otimização do tempo de centrifugação na d-SPE.

1.3 Considerações finais sobre a otimização do método

Esta otimização permitiu estabelecer um método rápido, cerca de 1 hora para uma média de 10 amostras extraídas simultaneamente (excluindo a etapa de homogeneização das amostras), uma das grandes vantagens desta metodologia extrativa quando comparada com outras metodologias extrativas, tais como a SPE ou a LLE. Assim, visto que a preparação das amostras demora cerca de 80% do tempo total de análise, quanto menor o tempo de extração, mais rápido se verifica a análise total da amostra, muito importante num laboratório de rotina, ao qual se exige rapidez na resposta da análise.

2. Validação

2.1 Especificidade/Seletividade e Capacidade de Identificação

De acordo com os critérios definidos para a demonstração que o método de análise é seletivo, verificou-se que todas as alíquotas às quais não foram adicionados os analitos em estudo eram negativas, já pelo contrário todas as alíquotas às quais foram adicionados os analitos foram consideradas positivas. Neste sentido, demonstrou-se que o método é seletivo, visto que a percentagem de falsos negativos e de falsos positivos é zero. Na figura 11, a título de exemplo, é possível observar dois cromatogramas obtidos na análise de uma *pool* de fígados brancos sem e com fortificação dos analitos em estudo. No anexo B apresenta-se a confirmação inequívoca da amitriptilina nas alíquotas positivas, recorrendo aos critérios de identificação definidos, ilustrativa da confirmação qualitativa de todos os outros analitos.

Ainda de forma a avaliar a seletividade fortificaram-se três alíquotas de uma *pool* branca de fígados com 91 compostos (anexo A) passíveis de serem encontrados nas análises de rotina do SQTf (500 ng/g) e avaliou-se se estes interferiam com a identificação dos analitos em estudo. Sendo que a presença de um interferente é considerada inaceitável quando afeta a capacidade de identificação do analito (142,147). Segundo os resultados obtidos, não se verificam quaisquer interferências no T_r e nos iões característicos dos analitos em estudo.

Adicionalmente procedeu-se ao estudo da verificação se os analitos em estudo interferiam com a identificação do PI utilizado na confirmação qualitativa (promazina). Nesta avaliação concluiu-se que a identificação do PI não é afetado por nenhum dos analitos em estudo e, por isso, a promazina é um PI adequado para o procedimento de confirmação qualitativa dos analitos.

Em termos de interferentes provenientes da própria matriz biológica, uma vez que o fígado é uma matriz muito complexa e diversa, a sua presença é difícil de evitar, mas como não interferem com a confirmação qualitativa dos analitos em estudo, a sua presença foi considerada aceitável.

Assim, dado que o método cumpre os critérios de identificação definidos, que a percentagem de falsos positivos é 0, a percentagem de falsos negativos é inferior a 10 e que não existem interferências no T_r e nos iões selecionados para cada um dos analitos, a seletividade e a capacidade de identificação do método analítico ficam comprovadas.

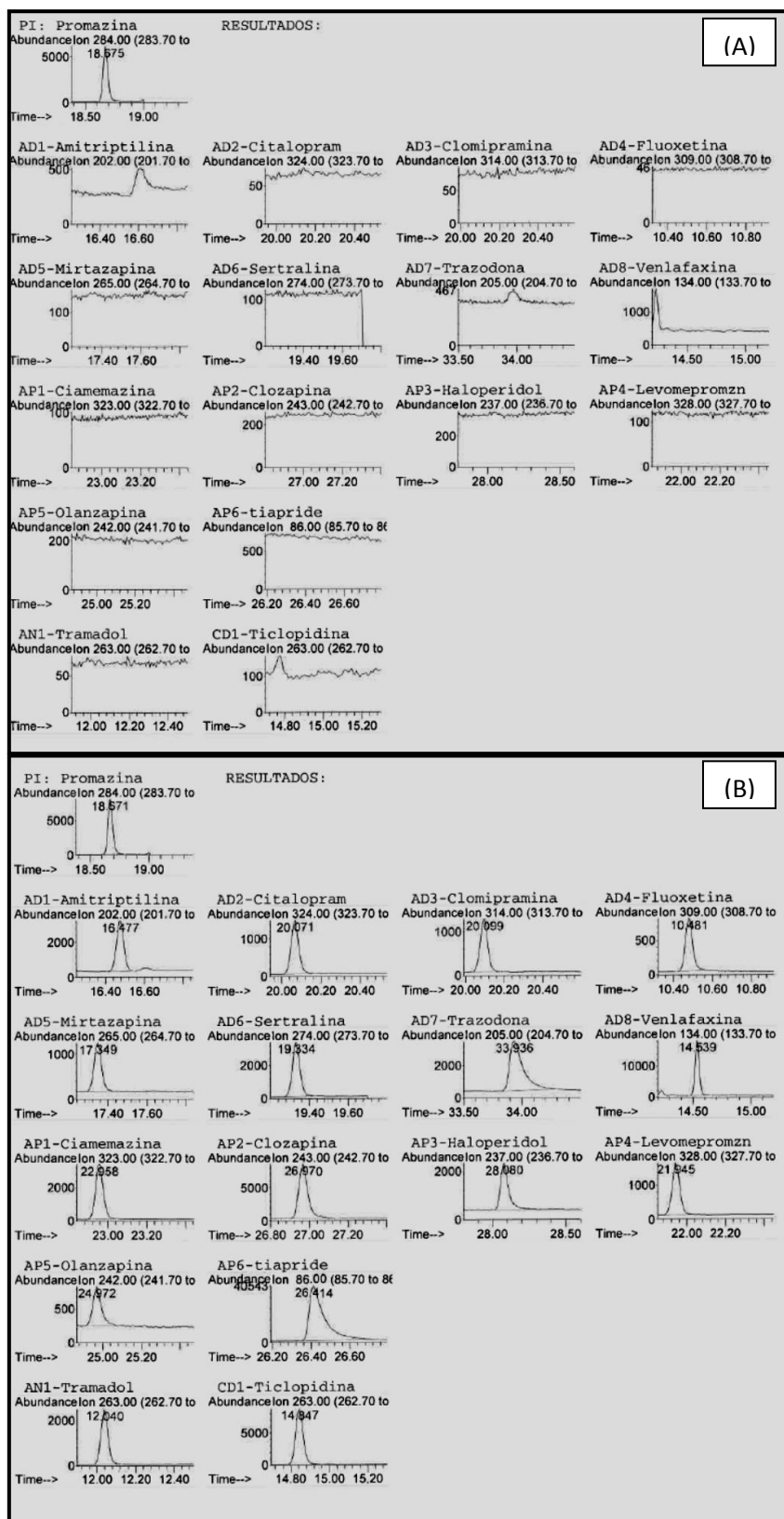


Figura 11. Cromatogramas obtidos no estudo da especificidade/seletividade numa MACRO desenvolvida internamente: (A) alíquota de *pool* de fígado não fortificada com os analitos em estudo; (B) alíquota da mesma *pool* de fígados fortificada com os analitos em estudo.

2.2 Avaliação do Efeito de Matriz

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que o EM para a maioria dos analitos em estudo não é significativo, já que está compreendido entre 90 e 110% (tabela 14). A sertralina, a fluoxetina e a clozapina são ligeiramente afetados pela matriz com 73, 84 e 85%, respectivamente. Já a levomepromazina e a olanzapina são muito afetados pela matriz com 46 e 6%, respectivamente. Este efeito já era esperado para a olanzapina, pois este analito é muito afetado por diferentes matrizes, como o sangue e a urina, como demonstraram os estudos de Chin *et al.* (155), se bem que estes estudos foram realizados com recurso a análise por LC-MS/MS. Sendo assim, a olanzapina é muito afetada pelas amostras de fígado e, por isso, foi excluída do estudo de validação do método desenvolvido.

Tabela 14. Resultados da avaliação do efeito de matriz para os medicamentos em estudo.

Medicamento	EM (%)
Olanzapina	6
Levomepromazina	46
Sertralina	73
Fluoxetina	84
Clozapina	85
Ciamemazina	90
Trazodona	91
Clomipramina	93
Haloperidol	101
Ticlopidina	101
Citalopram	102
Mirtazapina	102
Venlafaxina	104
Amitriptilina	105
Tramadol	108
Tiapride	110

2.3 Linearidade

Os resultados do estudo do modelo de regressão linear são apresentados na tabela 15 e são baseados no tratamento de resultados (com recurso às funcionalidades do *Excel*) demonstrado no Anexo C, tendo como exemplo a ciamemazina.

III. Resultados e Discussão

2. Validação

Tabela 15. Resumo dos resultados obtidos pelo método de regressão linear para os medicamentos em estudo.

Medicamento	Ião (m/z)	Interseção	Declive	R ²	S _{y/x}	Intervalo de interceção da ordenada de origem	
						95% inferior	95% superior
Amitriptilina	202	-0,0742± 0,0082	0,0082± 0,0010	0,9970± 0,0028	0,1557± 0,0598	-0,2809± 0,1253	0,1325± 0,0434
Ciamemazina	323	-0,0472± 0,0249	0,0077± 0,0007	0,9973± 0,0037	0,0786± 0,0491	-0,1363± 0,0782	0,0419± 0,0351
Citalopram	238	-0,0574± 0,0072	0,0072± 0,0007	0,9975± 0,0026	0,1204± 0,0642	-0,1935± 0,1147	0,0786± 0,0395
Clomipramina	269	0,2008± 0,7778	0,0148± 0,0011	0,9964± 0,0035	0,3244± 0,1706	-0,1863± 0,9397	0,5878± 0,6600
Clozapina	243	-0,0997± 0,1288	0,0221± 0,0114	0,9975± 0,0036	0,2615± 0,1634	-0,4268± 0,2587	0,1647± 0,1315
Fluoxetina	309	-0,1589± 0,0717	0,0016± 0,0002	0,9972± 0,0020	0,1949± 0,0706	-0,3807± 0,1366	0,0628± 0,0700
Haloperidol	224	-0,7450± 0,2251	0,0176± 0,0012	0,9960± 0,0035	0,9382± 0,4378	-1,8065± 0,7056	0,3164± 0,2875
Levomepromazina	328	-0,1135± 0,0089	0,0089± 0,0023	0,9963± 0,0030	0,2007± 0,0576	-0,3812± 0,1620	0,1542± 0,0722
Mirtazapina	265	-0,0291± 0,0638	0,0026± 0,0002	0,9952± 0,0055	0,1438± 0,0752	-0,2165± 0,1589	0,1258± 0,0616
Sertralina	274	-0,6071± 0,1149	0,0182± 0,0012	0,9975± 0,0017	0,8164± 0,2326	-1,5328± 0,3090	0,3186± 0,2531
Tiapride	86	-4,8211± 7,3070	0,0530± 0,0137	0,9983± 0,0012	9,9835± 5,9084	-16,1155± 12,5639	6,4733± 6,0369
Ticlopidina	110	-2,1640± 0,5477	0,0522± 0,0077	0,9954± 0,0029	3,0541± 0,6729	-5,6259± 1,2757	1,2980± 0,3259
Tramadol	263	-0,0301± 0,0684	0,0055± 0,0003	0,9971± 0,0034	0,0982± 0,0656	-0,1471± 0,1515	0,0869± 0,0225
Trazodona	205	-0,1925± 0,0120	0,0120± 0,0060	0,9958± 0,0031	0,2098± 0,0759	-0,5864± 0,2312	0,0988± 0,0943
Venlafaxina	134	-0,7857± 0,2174	0,0227± 0,0026	0,9965± 0,0029	1,1455± 0,3407	-2,0831± 0,5881	0,5117± 0,1897

Tendo em consideração os critérios de aceitação da linearidade, comprova-se a linearidade no intervalo de concentrações apresentado para todos os analitos em estudo, visto o R² ser superior a 0,99, as curvas de calibração obtidas incluem o valor zero, para um intervalo de confiança de 95%, e a distribuição dos resíduos não revelar tendências.

Porém, a linearidade não pode ser estabelecida recorrendo apenas aos parâmetros obtidos pela regressão linear, utilizando-se, por isso, o teste de Mandel na avaliação da linearidade, de forma a demonstrar qual dos modelos, linear ou não linear, ajusta melhor os pontos de calibração. Os valores determinados para o teste de Mandel (F_{cal}) e o respetivo critério de decisão (F_{crit}) estão descritos na tabela 16.

Tabela 16. Resumo dos resultados obtidos para o Teste de Mandel para os medicamentos em estudo.

Medicamento	N	Teste Mandel (F_{cal})	Critério de decisão
			$F_{cal} \leq F_{crit} (N-1; N-1; 0,95)$
Amitriptilina	8	2,69	$F_{crit} = 3,79$
Ciamemazina	9	3,04	$F_{crit} = 3,44$
Citalopram	9	3,60	$F_{crit} = 3,44$
Clomipramina	9	2,79	$F_{crit} = 3,44$
Clozapina	9	2,83	$F_{crit} = 3,44$
Fluoxetina	9	3,84	$F_{crit} = 3,44$
Haloperidol	9	3,72	$F_{crit} = 3,44$
Levomepromazina	8	1,83	$F_{crit} = 3,79$
Mirtazapina	9	3,60	$F_{crit} = 3,44$
Sertralina	9	2,20	$F_{crit} = 3,44$
Tiapride	9	4,35	$F_{crit} = 3,44$
Ticlopidina	9	3,55	$F_{crit} = 3,44$
Tramadol	9	2,41	$F_{crit} = 3,44$
Trazodona	7	2,34	$F_{crit} = 4,28$
Venlafaxina	9	3,41	$F_{crit} = 3,44$

Comparando os valores de teste (F_{cal}) com o F_{crit} verifica-se que para o citalopram, a fluoxetina, o haloperidol, a mirtazapina, o tiapride e a ticlopidina, o modelo linear não é o modelo mais adequado para o melhor ajuste dos pontos de calibração ($F_{cal} > F_{crit}$). Para os restante analitos o modelo de regressão linear é o que melhor se adequa ao ajuste dos pontos de calibração, para o intervalo de concentrações selecionado ($F_{cal} < F_{crit}$), sendo a função de calibração linear.

2.3.1 Gama de trabalho

O estudo da gama de trabalho foi realizado recorrendo ao modelo de regressão linear, partindo do pressuposto que o modelo é homocedástico, ou seja, que as concentrações de analito adicionadas à matriz estão isentas de erros e que os resíduos são independentes, apresentam uma distribuição normal e a mesma variância no intervalo de concentrações estudado (140,143). Este pressuposto nem sempre se verifica e, por isso, é importante verificar se existem diferenças estatisticamente significativas entre os valores de variâncias ao longo da gama de trabalho, sendo que essa verificação é feita com a aplicação do teste de homogeneidade de variâncias (PG).

Na tabela 17 apresentam-se os resultados obtidos no teste de homogeneidade de variâncias e a comparação com o respetivo critério de decisão. Conclui-se que, para todos

III. Resultados e Discussão

2. Validação

os analitos em estudo, existem diferenças estatisticamente significativas entre as variâncias nos extremos da gama de trabalho e que, por isso, a gama de trabalho não está bem ajustada, tratando-se de um modelo heterocedástico.

Tabela 17. Resumo dos resultados obtidos no teste de homogeneidade de variâncias para os medicamentos em estudo.

Medicamento	Teste de homogeneidade de variâncias (PG)	Critério de decisão $PG \leq F_{crit} (4;4;0,95)$
Amitriptilina	201,37	$F_{crit} = 6,39$
Ciamemazina	7781,39	
Citalopram	560,93	
Clomipramina	10764,53	
Clozapina	48127,35	
Fluoxetina	3739,60	
Haloperidol	3439,63	
LevomEPROMAZINA	57236,83	
Mirtazapina	920,39	
Sertralina	307,18	
Tiapride	12204,48	
Ticlopidina	4482,39	
Tramadol	1659,52	
Trazodona	266,28	
Venlafaxina	7257,73	

A diminuição da gama de trabalho pode ser um recurso quando não se verifique a homogeneidade de variâncias, como se observa neste caso, até se verificar uma diferença entre as variâncias que permita obter $PG \leq F_{crit}$. (124) No entanto, o método dos mínimos quadrados ponderados revelou-se a solução mais viável para encontrar a equação da curva de calibração que melhor se ajusta aos resultados obtidos experimentalmente (130,135,145).

2.3.2 Regressão linear ponderada

Tendo em conta o referido relativamente à gama de trabalho, estimou-se qual o fator de ponderação que melhor ajusta as discrepâncias entre as variâncias dos diferentes pontos de calibração. Para isso, estimou-se o ER% que compara a concentração obtida através da equação da reta resultante da regressão com a concentração teórica do analito em estudo na amostra fortificada.

Sendo assim, e escolhidos os seis fatores de ponderação empíricos, compararam-se os valores obtidos para o $\sum ER(\%)$ de todos esses fatores com o modelo de RLS (figura 12 e Tabela 18).

A figura 12 apresenta os gráficos do $ER(\%)$ em função da concentração, referentes à ciamemazina, para o modelo de RLS e para os restantes fatores de ponderação $(\frac{1}{x}; \frac{1}{x^2}; \frac{1}{\sqrt{x}}; \frac{1}{y}; \frac{1}{y^2}; \frac{1}{\sqrt{y}})$ e na tabela 18, também relativo à ciamemazina, encontram-se os valores obtidos para o $ER(\%)$ e para o $\sum ER(\%)$ para cada ponderação, bem como o valor de R^2 .

Observando os gráficos da figura 12, percebe-se que para o modelo de RLS há uma sobrestimação dos valores de concentração correspondentes às concentrações mais baixas da curva de calibração. Valores esses que são atenuados pelos fatores de ponderação $\frac{1}{x^2}, \frac{1}{y}$ e $\frac{1}{y^2}$. E, para além disso, para os fatores de ponderação mencionados os valores de $ER(\%)$ encontram-se dispostos de forma aleatória e paralelamente ao eixo horizontal, indicando que se apresentam como os fatores mais adequados para um melhor ajuste das variâncias entres os pontos de calibração no caso da ciamemazina.

Posto isto e com recurso aos dados da tabela 18 determina-se que o fator de ponderação mais adequado para a ciamemazina é o fator $\frac{1}{y^2}$, já que apresenta um menor $\sum ER(\%)$ (238,84) e um R^2 superior a 0,99 (0,9949).

Na tabela 19 podem ser consultados os fatores de ponderação eleitos para cada um dos medicamentos em estudo.

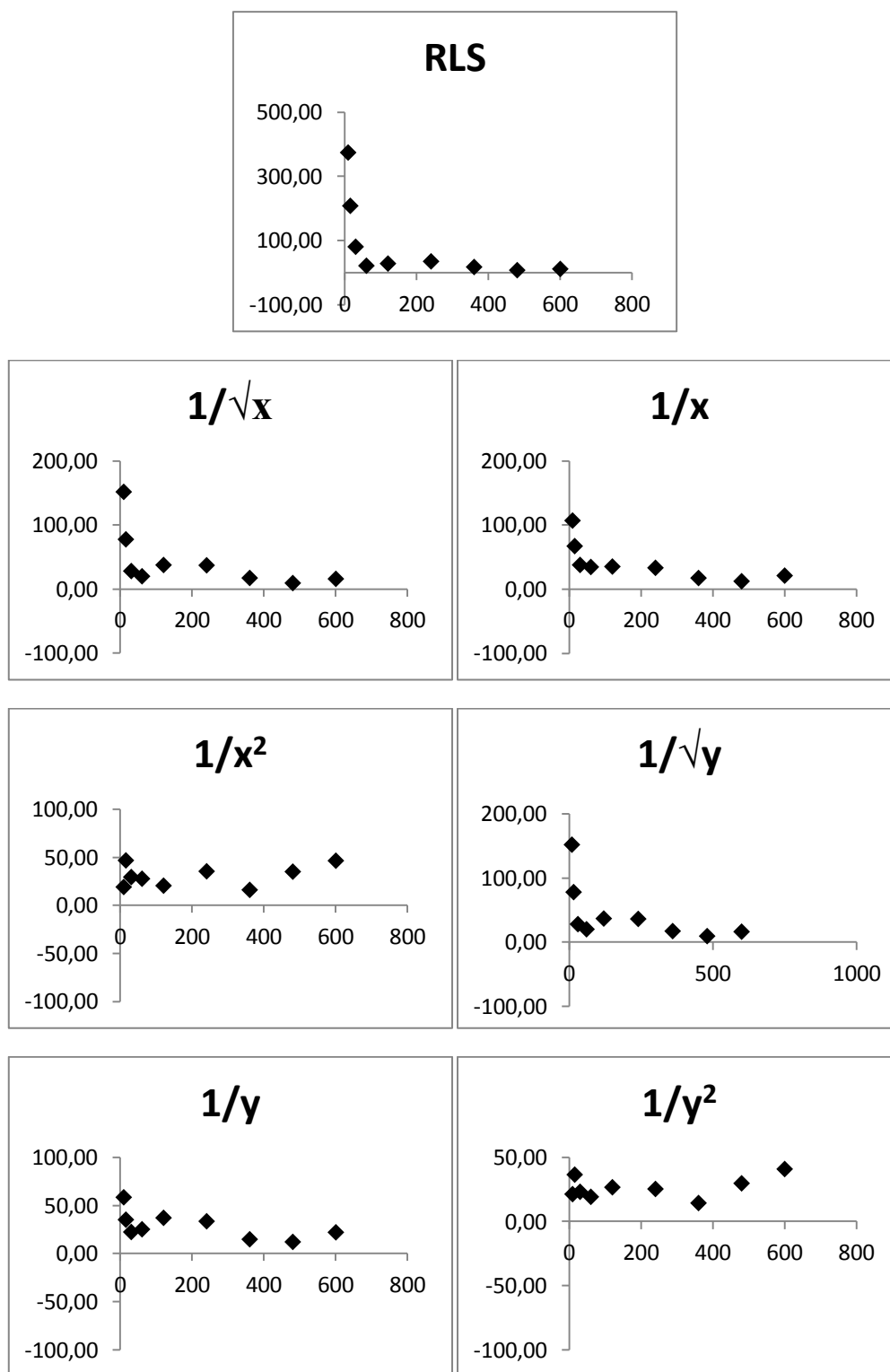


Figura 12. Distribuição do ER% em função da concentração de ciamemazina obtida para os vários fatores de ponderação.

III. Resultados e Discussão

2. Validação

Tabela 18. ER% por recurso à regressão linear simples e ponderada para cada fator de ponderação, referente à ciamemazina.

Concentração (ng/g)	Ponderação						
	RLS	$\frac{1}{\sqrt{x}}$	$\frac{1}{x}$	$\frac{1}{x^2}$	$\frac{1}{\sqrt{y}}$	$\frac{1}{y}$	$\frac{1}{y^2}$
9	375,13	151,69	106,86	19,14	152,20	58,71	21,49
15	208,81	77,60	67,03	46,77	78,19	35,43	36,71
30	81,19	28,13	37,66	29,47	28,20	22,62	23,32
60	21,96	20,00	34,47	27,72	20,20	25,46	19,40
120	28,72	37,57	35,12	20,51	36,94	37,36	26,86
240	35,58	37,10	33,15	35,43	36,35	33,77	25,53
360	18,02	17,33	17,26	16,13	17,33	15,05	14,55
480	8,06	9,37	12,20	35,10	9,54	12,32	29,91
600	11,89	15,95	20,99	46,46	16,44	22,28	41,07
\sum ER(%)	789,35	394,74	364,73	276,73	395,38	262,98	238,84
R ²	0,9973	0,9974	0,9971	0,9951	0,9972	0,9970	0,9949

Tabela 19. Resumo dos resultados obtidos relativamente ao fator de ponderação mais adequado para os medicamentos em estudo.

Medicamento	Ponderação
Amitriptilina	$\frac{1}{x^2}$
Ciamemazina	$\frac{1}{y^2}$
Citalopram	$\frac{1}{y}$
Clomipramina	$\frac{1}{x^2}$
Clozapina	$\frac{1}{x^2}$
Fluoxetina	$\frac{1}{x^2}$
Haloperidol	$\frac{1}{x^2}$
Levomepromazina	$\frac{1}{x^2}$
Mirtazapina	$\frac{1}{y^2}$
Sertralina	$\frac{1}{y^2}$
Tiapride	$\frac{1}{x^2}$
Ticlopidina	$\frac{1}{x^2}$
Tramadol	$\frac{1}{x^2}$
Trazodona	$\frac{1}{x^2}$
Venlafaxina	$\frac{1}{y^2}$

2.4 Limite de Detecção

Os LOD determinados, com base na razão S/N, para os analitos em estudo são apresentados na tabela 20.

Os LOD são, exceto para o haloperidol e para a levomepromazina, inferiores ao limite mínimo de concentração terapêutica em plasma. Para a olanzapina não foi exequível determinar o LOD, visto que não foi possível identificar este analito de acordo com os critérios de identificação e com uma razão S/N superior a 3 até uma concentração de 60 ng/g, concentração esta que se encontra acima do limite superior da concentração terapêutica. Esta impossibilidade foi também observada no estudo de Garção *et al.* (156), na extração dos mesmos medicamentos em amostras de sangue total com recurso a SPE e análise por GC-MS (tabela 20). Esta incapacidade de determinação do LOD para a olanzapina deve-se, muito provavelmente, ao facto deste analito ser muito afetado pela matriz, como já referido, o que impede que seja detetado quando presente em concentrações baixas.

Em termos comparativos com bibliografia disponível (tabela 20), o LOD da amitriptilina (20 ng/g) é ligeiramente superior ao LOD determinado em sangue total (11,1 ng/g), com recurso a extração por QuEChERS e análise instrumental por GC-MS, por Plossl *et al.* (90), já o LOD do tramadol (5 ng/g) é semelhante ao determinado no referido estudo (5,6 ng/mL). Para os restantes medicamentos ainda não existem publicados estudos em amostras biológicas com recurso à extração por QuEChERS, não sendo por isso possível a sua comparação. É vantajoso comparar os valores de LOD obtidos, com os resultados obtidos no estudo efetuado por Garção *et al.*, dado serem estudados os mesmos analitos incluídos neste estudo, no mesmo laboratório, ainda que em matrizes biológicas diferentes e no mesmo equipamento (GC-MS) (156). Assim, por comparação (tabela 20) observa-se que os LOD para a ciamemazina, a clozapina, a levomepromazina, a ticlopidina e o tramadol neste estudo são mais baixos, o que representa uma vantagem e uma mais-valia em termos de sensibilidade; o citalopram, a clomipramina e a trazodona apresentam valores de LOD iguais aos determinados por extração em sangue total por SPE; enquanto que a amitriptilina, a fluoxetina, o haloperidol, a mirtazapina, a sertralina, o tiapride e a venlafaxina têm LOD superiores neste estudo, contudo por serem matrizes mais complexas e pelo facto das concentrações destes analitos no fígado serem superiores às apresentadas nas amostras de sangue, visto que é no fígado que se processa a metabolização destes

analitos e também, tendo em conta, que estão abaixo dos valores de concentrações terapêuticas, são considerados valores adequados.

2.5 Limite de Quantificação

Na tabela 20 apresentam-se os valores dos LOQ para os analitos em estudo.

Estes valores de LOQ são correspondentes à concentração dos calibradores mais baixos, utilizados nas curvas de calibração durante o estudo da linearidade, nos quais foi possível confirmar a presença dos analitos em estudo de acordo com os critérios de identificação já mencionados e com uma precisão e uma exactidão adequadas ($<20\%$ e $\pm 20\%$, respetivamente) – anexo D, no qual é dado como exemplo ilustrativo a determinação do LOQ para a Ciamemazina, e tabelas 22 e 23, nas quais são expressas a precisão (repetibilidade) e exactidão do método para cada analito, bem como a concentração de LOQ.

Foram obtidos LOQ inferiores a 100 ng/g, exceto para o tiapride (180 ng/g), valores estes que são inferiores aos apresentados por Garção *et al.* (156), exceto para a fluoxetina, o haloperidol e a mirtazapina (tabela 20). Comparativamente com os estudos de Plossl *et al.* (90), os valores de LOQ são semelhantes para a amitriptilina e para o tramadol (27,5 e 11,3, respetivamente), conforme descrito na tabela 20.

2.6 Recuperação (Eficiência da Extração)

Na tabela 21 são apresentados os valores de recuperação, em percentagem, da extração por QuEChERS, obtidos para cada um dos analitos em estudo (n corresponde ao número de replicados).

Os resultados obtidos mostram uma eficiência de extração, representada pelos valores de recuperação, para três níveis de concentração (gama baixa, média e alta), bastante aceitável, com valores compreendidos entre 71,51 e 116,02% (exceto para a sertralina) na gama baixa, entre 68,42 e 98,35% na gama média e entre 51,89 e 97,95% na gama alta. A sertralina apresenta um valor de recuperação na gama baixa de 46,35%, valor um pouco abaixo dos restantes analitos, o que pode ser explicado pelo maior efeito de matriz que a afeta relativamente aos restantes analitos (conforme já referido na tabela 14).

Os valores de recuperação médios mais elevados, com exceção para a fluoxetina, o haloperidol, a sertralina e a trazodona, foram obtidos na gama baixa de concentrações. Os quatro analitos mencionados apresentam uma recuperação média mais elevada para a gama média de concentrações.

III. Resultados e Discussão

2. Validação

Tabela 20. LOD e LOQ do método extrativo QuEChERS em amostras de fígado *post-mortem* desenvolvido neste trabalho e comparação com LOD e LOQ publicados na literatura para os medicamentos em estudo.

Medicamento	LOD (ng/g) Fígado QuEChERS	LOQ (ng/g) Fígado QuEChERS	LOD (ng/mL) Sangue total SPE (156)	LOQ (ng/mL) Sangue total SPE (156)	LOD (ng/mL) Sangue total QuEChERS (90)	LOQ (ng/mL) Sangue total QuEChERS (90)
Amitriptilina	20	25	10	50	11,1	27,5
Ciamemazina	5	9	10	50	-	-
Citalopram	10	25	10	50	-	-
Clomipramina	10	15	10	50	-	-
Clozapina	5	9	10	50	-	-
Fluoxetina	50	90	12,5	50	-	-
Haloperidol	20	36	5	25	-	-
Levomepromazina	10	25	12,5	50	-	-
Mirtazapina	20	60	6,25	25	-	-
Olanzapina	-	-	-	-	-	-
Sertralina	20	36	12,5	50	-	-
Tiapride	100	180	40	200	-	-
Ticlopidina	10	36	20	100	-	-
Tramadol	5	15	10	50	5,6	11,3
Trazodona	20	30	20	100	-	-
Venlafaxina	20	36	10	50	-	-

III. Resultados e Discussão

2. Validação

Valores de recuperação próximos de 100% são ambicionados, contudo valores inferiores e superiores são aceites, desde que a precisão, a exatidão e os limiares analíticos sejam aceitáveis (129,133).

Tabela 21. Recuperação média, em percentagem, da fase de extração, para cada um dos medicamentos em estudo, determinada para três níveis de concentração.

Medicamento	Gama Baixa (n=3)		Gama Média (n=4)		Gama Alta (n=3)	
	Concentração (ng/g)	Recuperação (%)	Concentração (ng/g)	Recuperação (%)	Concentração (ng/g)	Recuperação (%)
Amitriptilina	250	116,02	500	76,10	750	61,78
Ciamemazina	150	93,21	300	81,75	450	63,36
Citalopram	250	96,93	500	87,47	750	68,56
Clomipramina	250	93,31	500	79,5	750	62,52
Clozapina	150	91,86	300	79,14	450	63,65
Fluoxetina	1500	71,51	3000	81,73	4500	70,74
Haloperidol	600	75,74	1200	88,26	1800	81,63
Levomepromazina	250	73,68	500	73,12	750	59,23
Mirtazapina	600	86,27	1200	73,43	1800	54,63
Sertralina	600	46,35	1200	78,03	1800	62,66
Tiapríde	3000	109,1	6000	79,1	9000	67,91
Ticlopidina	600	74,74	1200	68,42	1800	51,89
Tramadol	250	94,61	500	89,05	750	70,47
Trazodona	150	90,65	300	98,35	450	97,95
Venlafaxina	600	91,91	1200	83,97	1800	72,16

2.7 Precisão (Repetibilidade e Precisão intermédia) e Exactidão

Os resultados obtidos relativamente à precisão e exatidão do método analítico encontram-se sumariados nas tabelas 22, 23 e 24.

Em termos de repetibilidade o método desenvolvido mostrou-se adequado à quantificação de todos os analitos em estudo, visto apresentar um CV(%) igual ou inferior a 20% para os valores próximos do LOQ e inferior a 15% para as restantes gamas de concentração (tabelas 22 e 23), sendo a única exceção a levomepromazina, que apresenta um valor de repetibilidade acima do critério descrito para verificação da adequabilidade da repetibilidade do método desenvolvido.

Para todos os analitos (Tabela 24), à exceção da gama média de concentração da fluoxetina e da gama alta de concentração da levomepromazina, os valores de CV(%) da precisão intermédia encontravam-se dentro dos limites exigidos na literatura quanto à adequabilidade do método em termos de precisão ($\leq 20\%$ para concentrações próximas do LOQ e $< 15\%$ para as restantes gamas de concentração). No caso da gama alta da

III. Resultados e Discussão

2. Validação

levomepromazina e da gama média da fluoxetina, estas apresentaram valores de CV(%) superiores a 15% (18,08 e 16,84%, respetivamente), valores que não cumprem os critérios definidos pela literatura, mas estes critérios são aplicados na esmagadora maioria das vezes a amostras de sangue, urina ou plasma, amostras que apresentam uma menor complexidade comparativamente com outros tipos de amostras biológicas, como o cabelo ou o fígado, e, por isso, estes valores podem excecionalmente ser aceites. Este tipo de exceções em relação aos critérios de aceitação dos valores de precisão do método analítico foi também verificado no estudo em amostras de cabelo de Barroso *et al.* (147) e até em amostras de sangue no estudo de Usui *et al.* (16).

Relativamente à exatidão do método (Tabela 24), expressa pelo ERM (%), foi constatado que os valores obtidos para todas as gamas de concentração para todas as substância, à exceção da gama alta do haloperidol, estão de acordo com os limites estabelecidos como aceitáveis na literatura ($\pm 20\%$ para concentrações próximas do LOQ e $\pm 15\%$ para as restantes gamas de concentração). O valor de exatidão (15,81%) para a gama mais alta de concentração do haloperidol, não cumpre os critérios descritos, contudo foi aceite, pelas mesmas razões apresentadas para a precisão e pelo facto de no SQTF ser aceite um limite de $\pm 20\%$ para todas as gamas de concentração.

Tabela 22. Resumo dos resultados obtidos para a repetibilidade do método.

Medicamento	Concentração real (ng/g)	Concentração estimada (ng/g)	CV (R) (%)	ERM (%)
Amitriptilina	25	24,33	9,18	-2,69
	50	45,65	3,73	-8,71
	400	376,73	6,17	-5,82
	1000	1023,30	3,07	2,33
Ciamemazina	9	9,57	5,73	6,38
	15	14,70	3,91	-1,98
	30	28,73	3,26	-4,23
	240	224,54	5,75	-6,44
	600	553,98	8,52	-7,67
Citalopram	15	21,27	6,09	41,81
	25	25,59	2,88	2,35
	50	47,31	1,17	-5,38
	400	373,25	5,00	-6,69
	1000	982,28	3,04	-1,77
Clomipramina	15	16,86	1,51	12,42
	25	21,76	5,63	-12,95
	50	47,29	8,31	-5,42
	400	390,70	7,04	-2,33
	1000	968,88	2,47	-3,11
Clozapina	9	8,81	3,50	-2,13
	15	16,32	8,42	8,83
	30	27,43	2,09	-8,56
	240	231,04	2,93	-3,74
	600	559,89	11,96	-6,69

III. Resultados e Discussão

2. Validação

Tabela 23. Continuação do resumo dos resultados obtidos para a repetibilidade do método.

Continuação				
Medicamento	Concentração real (ng/g)	Concentração estimada (ng/g)	CV (R) (%)	ERM (%)
Fluoxetina	90	98,54	4,64	9,48
	150	161,51	5,07	7,67
	300	268,38	6,25	-10,54
	2400	2345,20	4,63	-2,28
	6000	6376,31	4,05	6,27
Haloperidol	36	38,80	4,00	7,77
	60	60,41	3,12	0,68
	120	106,61	3,26	-11,16
	960	897,89	5,11	-6,47
	2400	2505,09	3,49	4,38
Levomepromazina	25	25,21	4,27	0,84
	50	47,19	5,24	-5,63
	400	361,94	4,94	-9,52
	1000	676,62	36,96	-32,34
Mirtazapina	36	28,08	11,09	-22,00
	60	64,20	6,37	7,00
	120	108,01	3,09	-9,99
	960	899,45	7,56	-6,31
	2400	2608,21	3,59	8,68
Sertralina	36	42,49	9,25	18,03
	60	70,44	5,70	17,41
	120	113,98	3,29	-5,01
	960	882,76	5,78	-8,05
	2400	2508,90	2,72	4,54
Tiapride	180	184,93	4,43	2,74
	300	270,13	6,72	-9,96
	600	540,61	4,84	-9,90
	4800	4554,02	6,66	-5,12
	12000	12255,85	7,23	2,13
Ticlopidina	36	38,24	3,71	6,23
	60	60,20	4,48	0,34
	120	103,65	5,79	-13,62
	960	877,58	7,44	-8,58
	2400	2537,59	3,55	5,73
Tramadol	15	15,45	6,38	3,01
	25	27,49	6,87	9,94
	50	49,47	5,00	-1,05
	400	385,88	5,34	-3,53
	1000	958,86	3,70	-4,11
Trazodona	30	30,97	6,33	3,24
	240	216,12	5,80	-9,95
	600	579,73	5,46	-3,38
Venlafaxina	36	36,62	2,50	1,72
	60	60,80	3,48	1,33
	120	109,96	3,16	-8,36
	960	911,88	6,18	-5,01
	2400	2475,22	2,98	3,13

III. Resultados e Discussão

2. Validação

Tabela 24. Resumo dos resultados obtidos para a precisão intermédia e a exatidão do método, para três gamas de concentração.

Medicamento	Concentração Real (ng/g)	Concentração Estimada (ng/g)	CV (SI) (%)	ERM (%)
Amitriptilina	250	235,58	6,26	-5,77
	500	474,10	5,60	-5,18
	750	738,59	8,74	-1,52
Ciamemazina	150	144,55	8,31	-3,63
	300	285,66	7,47	-4,78
	450	427,64	10,52	-4,97
Citalopram	250	230,59	5,64	-7,76
	500	473,95	5,66	-5,21
	750	734,73	7,18	-2,04
Clomipramina	250	226,82	8,85	-9,27
	500	445,78	6,80	-10,84
	750	668,82	10,45	-10,82
Clozapina	150	143,98	8,65	-4,02
	300	282,02	7,60	-5,99
	450	420,36	6,65	-6,59
Fluoxetina	1500	1353,76	10,62	-9,75
	3000	2676,52	16,84	-10,78
	4500	4030,25	12,42	-11,90
Haloperidol	600	645,78	6,07	7,63
	1200	1314,82	6,57	9,57
	1800	2084,50	5,96	15,81
Levomepromazina	250	248,14	12,02	-0,74
	500	488,79	11,59	-2,24
	750	766,32	18,08	2,18
Mirtazapina	600	556,80	9,34	-7,20
	1200	1131,15	8,88	-5,74
	1800	1747,06	12,47	-2,94
Sertralina	600	554,41	7,13	-7,60
	1200	1099,54	9,66	-8,37
	1800	1696,84	8,99	-4,03
Tiapride	3000	2551,17	4,40	-14,96
	6000	5349,44	5,39	-10,84
	9000	7871,82	6,48	-12,54
Ticlopidina	600	543,81	6,99	-9,36
	1200	1104,91	7,89	-7,92
	1800	1721,24	11,04	-4,38
Tramadol	250	235,00	7,65	-6,00
	500	468,97	6,57	-6,21
	750	725,52	8,51	-3,26
Trazodona	150	142,01	6,16	-5,33
	300	283,44	6,85	-5,52
	450	432,27	9,66	-3,94
Venlafaxina	600	557,79	7,15	-7,04
	1200	1139,08	6,92	-5,08
	1800	1771,30	9,98	-1,59

2.8 Arrastamento (do inglês *carryover*)

Os resultados obtidos no estudo do fenómeno de arrastamento estão apresentados na tabela 25. Observou-se que neste estudo não se verificam fenómenos de arrastamento para nenhum dos medicamentos em estudo nas concentrações estudadas.

Tabela 25. Dados do estudo quantitativo do fenómeno de arrastamento.

Medicamento	Injeção	Área Absoluta m/z	T _r (min)	Área PI m/z
Amitriptilina 750 ng/g	Amostra	217168	16.466	39660
	BR 1	nd	nd	41419
	BR 2	nd	nd	41447
Ciamemazina 450 ng/g	Amostra	125376	22.947	39660
	BR 1	nd	nd	41419
	BR 2	nd	nd	41447
Citalopram 750 ng/g	Amostra	207971	20.060	39660
	BR 1	nd	nd	41419
	BR 2	nd	nd	41447
Clomipramina 750 ng/g	Amostra	453366	20.088	39660
	BR 1	nd	nd	41419
	BR 2	nd	nd	41447
Clozapina 450 ng/g	Amostra	367048	26.976	39660
	BR 1	nd	nd	41419
	BR 2	nd	nd	41447
Fluoxetina 4500 ng/g	Amostra	316853	10.464	39660
	BR 1	nd	nd	41419
	BR 2	nd	nd	41447
Haloperidol 1800 ng/g	Amostra	1195339	28.076	39660
	BR 1	nd	nd	41419
	BR 2	nd	nd	41447
Levomepromazina 750 ng/g	Amostra	231453	21.935	39660
	BR 1	nd	nd	41419
	BR 2	nd	nd	41447
Mirtazapina 1800 ng/g	Amostra	178140	17.357	39660
	BR 1	nd	nd	41419
	BR 2	nd	nd	41447
Sertralina 1800 ng/g	Amostra	1101995	19.328	39660
	BR 1	nd	nd	41419
	BR 2	nd	nd	41447
Tiapride 9000 ng/g	Amostra	13240055	26.427	39660
	BR 1	nd	nd	41419
	BR 2	nd	nd	41447
Ticlopidina 1800 ng/g	Amostra	3123472	14.830	39660
	BR 1	nd	nd	41419
	BR 2	nd	nd	41447
Tramadol 750 ng/g	Amostra	156378	12.027	39660
	BR 1	nd	nd	41419
	BR 2	nd	nd	41447
Trazodona 450 ng/g	Amostra	250237	33.994	39660
	BR 1	nd	nd	41419
	BR 2	nd	nd	41447
Venlafaxina 1800 ng/g	Amostra	1393870	14.527	39660
	BR 1	nd	nd	41419
	BR 2	nd	nd	41447

(nd – não detetado)

2.9 **Robustez**

A robustez foi avaliada conjuntamente com o estudo da precisão intermédia, de acordo com a Relacre (124), variando as condições de extração e análise (reagentes de diferentes lotes, diferentes soluções de reagentes, diferentes lotes de kits de QuEChERS, e diferentes equipamentos). Comprovou-se que o método desenvolvido para a confirmação qualitativa e quantitativa de medicamentos no fígado é robusto, não se verificando alterações na sua capacidade de identificação e quantificação de todos os analitos em estudo ao longo desta avaliação.

IV. Análise de Amostras Reais

IV. Análise de Amostras Reais

Concluída a validação do método desenvolvido, demonstrando a sua adequabilidade à extração por QuEChERS e posterior confirmação qualitativa e quantitativa de medicamentos em amostras de fígado *post-mortem* por GC-MS, aplicou-se o mesmo à análise de amostras reais para confirmação qualitativa e quantitativa dos medicamentos em estudo.

Foram analisadas 2 amostras de fígado *post-mortem*, colhidas nos anos de 2013 e 2014, provenientes dos Gabinetes Médico-Legais que atuam na dependência do INMLCF, I.P.. Previamente a esta análise já havia sido efetuada uma análise de triagem e confirmação qualitativa e quantitativa dos medicamentos em estudo, em sangue periférico *post-mortem*, através de extração por SPE e identificação por GC-MS (método desenvolvido e validado no SQTF).

Na tabela 26 estão descritas as duas amostras analisadas, quais os analitos identificados e quantificados durante o procedimento de triagem e confirmação qualitativa e quantitativa em sangue periférico *post-mortem* e quais os analitos identificados, bem como a sua concentração, através da análise das amostras de fígados *post-mortem* reais.

Nas figuras 13, 14 e 15 apresentam-se, a título de exemplo e relativamente à amostra B, a MACRO obtida e a confirmação qualitativa e quantitativa do tramadol, respetivamente.

Assim, pode-se afirmar que o método desenvolvido é um método adequado para a confirmação qualitativa e quantitativa de medicamentos em amostras de fígado *post-mortem*, visto que se confirmou a presença de todos os analitos esperados, cumprindo todos os critérios de identificação e se determinou a sua respetiva concentração. Além disso, permitiu a confirmação da presença e posterior quantificação de tramadol e trazodona na amostra A, medicamentos que não haviam sido identificados anteriormente no sangue periférico.

IV. Análise de Amostras Reais

Tabela 26. Resumo dos resultados obtidos na análise de amostras reais.

Tabela 28: Resumo dos Resultados Obtidos na análise de amostras reais.					
Amostra	Informação	Sangue periférico		Fígado	
		Triagem e Confirmação qualitativa	Confirmação Quantitativa	Confirmação qualitativa	Confirmação quantitativa
A	Idade: 36				
	Sexo: Masculino			Citalopram	187 ng/g
	Possível causa de morte:	Citalopram	542 ng/mL	Tramadol	43 ng/g
	Intoxicação			Trazodona	78 ng/g
	medicamentosa				
B	Idade: 70				
	Sexo: Feminino				
	Possível causa de morte:	Venlafaxina	655 ng/mL	Venlafaxina	168 ng/g
	Intoxicação	Tramadol	463 ng/mL	Tramadol	142 ng/g
	medicamentosa				

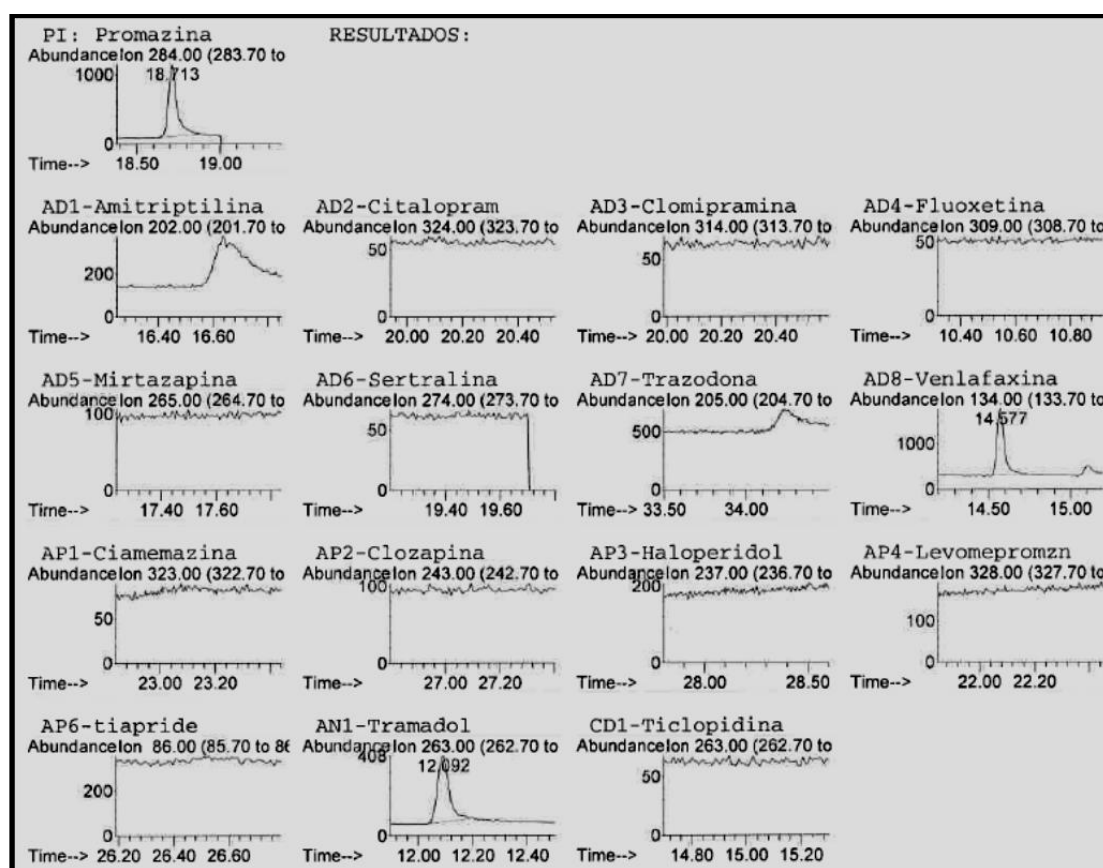


Figura 13. MACRO obtida na análise da amostra real B.

IV. Análise de Amostras Reais

Amostra:	B		Padrão Interno: Promazina		Operador: DP	
Substância:	Tramadol		Controlo: CM		Data: 30/06/2015	
Observações:	Controlo a 500 ng/g					
Controlo: CM	lão	Área	Área relativa	Tolerância	limite inferior	limite superior
1º lão	58	22122676	100,0%			
2º lão	263	670428	3,0%	50% rel.	1,5%	4,5%
3º lão	135	620808	2,8%	50% rel.	1,4%	4,2%
4º lão						
Tramadol (t.r.) =	12,102			0,1 abs.	12,002	12,202
Promazina (t.r.) =	18,713	t.r.r. =	0,647	1% rel.	0,640	0,653
Amostra: B	lão	Área	Área relativa	Conformidade		
1º lão	58	382539	100,0%	conforme		
2º lão	263	10002	2,6%	conforme		
3º lão	135	9419	2,5%	conforme		
4º lão						
Tramadol (t.r.) =	12,09			conforme		
Promazina (t.r.) =	18,711	t.r.r. =	0,646	conforme		

Figura 14. Confirmação qualitativa da presença do tramadol na amostra real B.

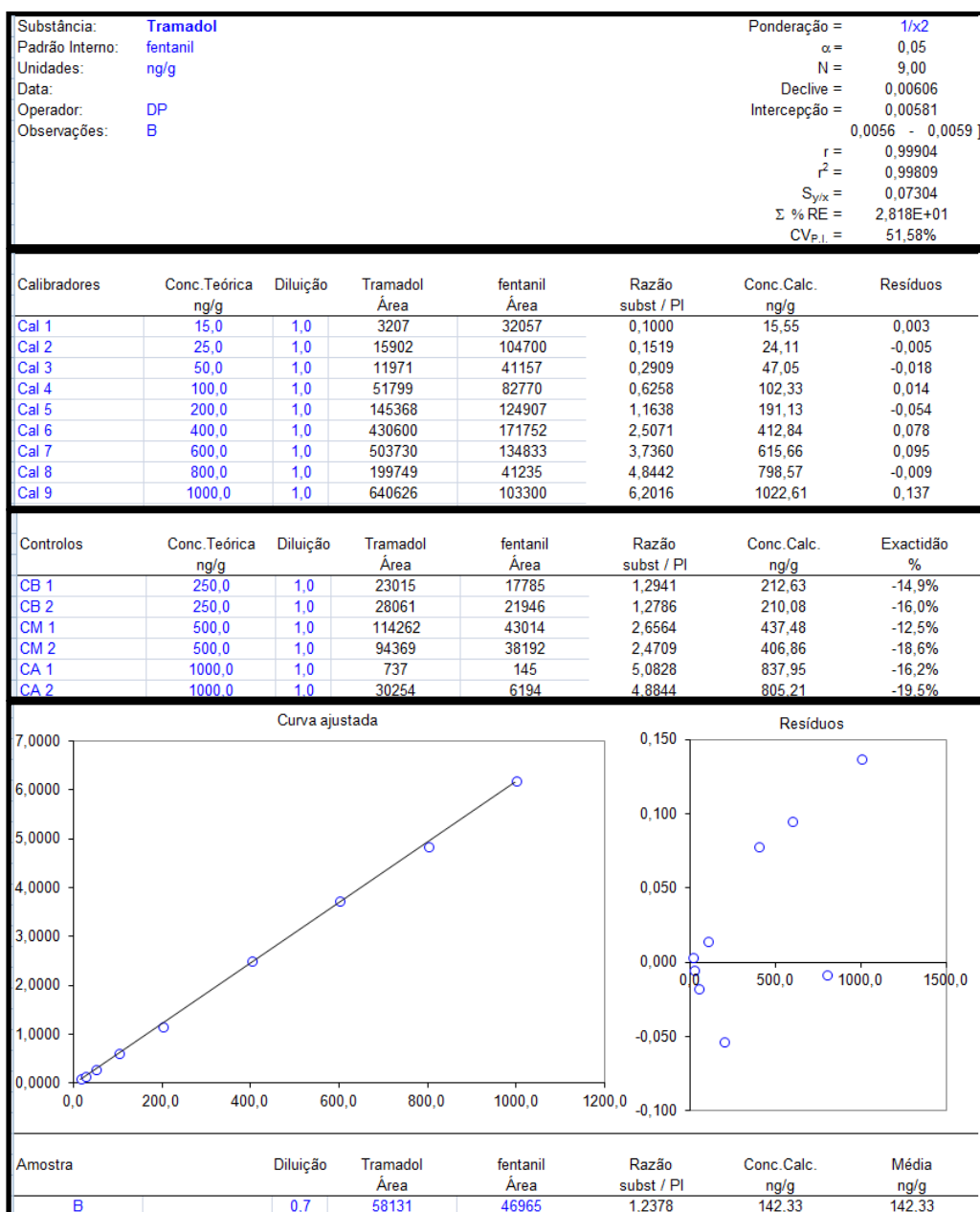


Figura 15. Confirmação quantitativa do tramadol na amostra real B.

V. Conclusão



V. Conclusão

Com esta dissertação desenvolveu-se, otimizou-se e validou-se um método rápido e simples de extração por QuEChERS e correspondente confirmação qualitativa e quantitativa por GC-MS de medicamentos das classes dos analgésicos estupefacientes, anticoagulantes e antitrombóticos, antidepressores e antipsicóticos presentes em amostras de fígado *post-mortem*. É importante salientar que este é o primeiro método desenvolvido que recorre a QuEChERS para extração simultânea destes medicamentos de amostras de fígado *post-mortem*.

A preparação das amostras, etapa essencial num serviço de química e toxicologia forenses, devido à complexidade das amostras biológicas analisadas, em particular o fígado, foi feita com recurso a uma metodologia extrativa relativamente recente e ainda pouco aplicada à análise forense designada por QuEChERS.

Baseado na literatura existente relativa a esta metodologia extrativa, desenvolveu-se um método aplicado às amostras de fígado, nos quais os principais fatores suscetíveis de influenciar a extração foram otimizados (através de uma otimização univariada) e avaliados de forma a estabelecer um método rápido, simples e com uma maior adequação ao tipo de analitos em estudo, através de maior eficiência da extração, bem como a obtenção de valores baixos de LOD e LOQ. Foram otimizados nove fatores, a vários níveis: tipo e volume de solvente de extração; percentagem de ácido acético no solvente de extração; quantidade de sais ($\text{MgSO}_4 : \text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ (4:1)) adicionada na Extração em Fase Única; tempo de agitação e de centrifugação da Extração em Fase Única; composição dos adsorventes utilizados na d-SPE e tempo de agitação e de centrifugação na d-SPE. As condições ótimas estabelecidas para a Extração em Fase Única foram a utilização de 1,5 mL de solução de 1% de ácido acético em acetonitrilo, 0,5 g de $\text{MgSO}_4:\text{NaC}_2\text{H}_3\text{O}_2$ numa proporção de 4:1, 10 s de agitação e 2 min de centrifugação, enquanto que para a d-SPE as condições ótimas definidas são uma composição de adsorventes de C18 e MgSO_4 , 10 s de agitação e 3 min de centrifugação. Esta otimização permitiu estabelecer um método rápido, cerca de 1 hora para uma média de 10 amostras extraídas simultaneamente.

Previamente a esta extração, verificou-se necessária a homogeneização das amostras, etapa esta que também foi desenvolvida, e se mostra inovadora relativamente à análise toxicológica destes medicamentos em amostras de fígado *post-mortem*, visto ser realizada num homogeneizador de esferas, Precellys®24 da Bertin Technologies. Esta homogeneização foi realizada a 3800 rpm, durante 3 ciclos de 30 segundos com intervalos de 30 s entre cada ciclo.

V. Conclusão

As condições cromatográficas e instrumentais estabelecidas permitiram uma boa resolução entre os medicamentos em estudo, permitindo uma identificação inequívoca dos mesmos, de acordo com os critérios definidos pela WADA para identificação de analitos por GC-MS em modo de aquisição SIM, bem como a sua adequada quantificação, mesmo quando os analitos se apresentaram em simultâneo nas amostras. Devido à ausência de análogos deuterados, foram utilizados como padrão interno dois compostos semelhantes aos analitos em estudo, a promazina e o fentanil, para o procedimento de confirmação qualitativa e de quantificação, respetivamente.

O método mostrou-se seletivo, sem interferências, com 0% de falsos positivos e negativos; linear dentro da gama estudada, recorrendo a uma regressão linear ponderada; com LOD entre 5 e 100 ng/g e LOQ entre 9 e 180 ng/g; recuperações entre 51,89 e 116,02%, exceto para a sertralina (46,35%); preciso e exato; robusto e sem fenómenos de arrastamento, segundo os critérios estabelecidos. Foi ainda avaliado o efeito de matriz que se revelou muito elevado para a olanzapina, fazendo com que este medicamento fosse excluído da restante validação.

O método desenvolvido e validado foi aplicado à análise de duas amostras reais, com resultados inequívocos quanto à presença dos analitos em estudo.

Assim, os resultados obtidos no estudo de validação do método desenvolvido e a sua aplicação à análise de amostras reais atestam a sua adequabilidade à extração, confirmação qualitativa e quantitativa de amitriptilina, ciamemazina, citalopram, clomipramina, clozapina, fluoxetina, haloperidol, levomepromazina, mirtazapina, sertralina, tiapride, ticlopidina, tramadol, trazodona e venlafaxina em amostras de fígado *post-mortem*, podendo ser aplicado em análises de rotina de um serviço de química e toxicologia forenses.

Por tudo isto, pode-se afirmar que todos os objetivos propostos inicialmente foram cumpridos.

VI. Perspetivas futuras



VI. Perspetivas futuras

Em termos de perspetivas futuras, este método analítico pode ser otimizado de modo a ser aplicado à pesquisa de outros medicamentos, bem como de outros analitos habitualmente analisados num laboratório de química e toxicologia forenses, como drogas de abuso e/ou pesticidas, em amostras de fígado *post-mortem*.

Este método pode ainda ser testado para a análise dos medicamentos estudados neste trabalho e de outros analitos noutras amostras biológicas complexas e de difícil extração e análise, tais como rim, pulmão, músculo, conteúdo gástrico ou mecónio.

Relativamente à validação do método analítico desenvolvido poderá ser ainda determinada a estabilidade dos analitos e a incerteza.

Em suma, perspectivam-se novas aplicações desta metodologia analítica na análise das mais variadas classes de compostos presentes em diferentes matrizes biológicas.

VII. Referências Bibliográficas

+

VII. Referências bibliográficas

A lista apresentada foi elaborada em conformidade com as diretrizes do International Committee of Medical Journal Editors (grupo de Vancouver): “Recommendations for the Conduct, Reporting, Editing and Publication of Scholarly Work in Medical Journals: Sample References”, cujas diretrizes [última modificação em 2013 Aug 20; consultado em 2014 Out 10] estão disponíveis em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

1. World Health Organization. WHO Medicines Strategy: Countries at the Core 2004-2007 [Internet]. 2004. Available from: http://whqlibdoc.who.int/hq/2004/WHO_EDM_2004.5.pdf
2. Ferreira AMR, Borges A, Rangel R, Monsanto P, Dias MJ, Carvalho MCD De. Avaliação das intoxicações medicamentosas em Portugal. 2008;17.
3. Calabuig JAG, Grifo MSG. Intoxicaciones por medicamentos. In: Cañadas EV, Calabuig JAG, editors. Medicina Legal y Toxicología. 2005.
4. Infarmed. Glossário [Internet]. [cited 2014 Oct 1]. Available from: https://www.infarmed.pt/portal/pls/portal/!PORTAL.wwpob_page.show?_docname=8661172.PDF
5. World Health Organisation. WHO lexicon of alcohol and drug terms. Geneva; 1994. p. 1–69.
6. INEM. Intoxicações por medicamentos foram o principal motivo das chamadas para o CIAV em 2010. Lisboa; 2011 Feb 25;
7. INE I.P., INSA I.P. Inquérito Nacional de Saúde 2005/2006 [Internet]. Inquérito Nacional de Saúde 2005/2006. Lisboa - Portugal; 2009 [cited 2015 Sep 1]. p. 330. Available from: https://www.ine.pt/xportal/xmain?xpid=INE&xpgid=ine_publicacoes&PUBLICACOESpub_boui=69365215&PUBLICACOESmodo=2
8. Santos AP, Domingos S. Reconciliação da medicação: um conceito aplicado ao hospital. ROF. 2013.
9. Infarmed. Estatística do Medicamento 2012 [Internet]. 2012 [cited 2015 Sep 1]. Available from: http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MONITORIZACAO_DO_MERCADO/OBSERVATORIO/ESTATISTICA_DO_MEDICAMENTO/ESTATISTICA_DO_MEDICAMENTO_ANTERIORES
10. Furtado C. Psicofármacos : Evolução do consumo em Portugal Continental (2000 – 2012) [Internet]. Infarmed, I.P. 2014. Available from: http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MONITORIZACAO_DO_MERCADO/OBSERVATORIO/ESTUDOS_REALIZADOS
11. Commission E, Eurobarometer. Saúde Mental [Internet]. 2010 [cited 2015 Sep 1]. Available from: http://ec.europa.eu/health/mental_health/eurobarometers/index_en.htm
12. Eurachem. Eurachem Guide: The Fitness for Purpose of Analytical Methods. 1st ed. Middlesex: LGC; 1998.
13. Magalhães EJ, Ribeiro de Queiroz MEL, Penido MLDO, Paiva MAR, Teodoro JAR, Augusti R, et al. Determination of cocaine in postmortem human liver exposed to overdose. Application of an innovative and efficient extraction/clean up procedure and gas chromatography-mass spectrometry analysis. J Chromatogr A [Internet]. Elsevier B.V.; 2013 Sep 27 [cited 2014 Nov 27];1309:15–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23972460>
14. Stevens J. Pharmaceuticals in Whole Blood Analyzed on Agilent Poroshell 120 , with Modified Mini-Extraction for Sample Preparation Application Note. Agil Technol. 2011;
15. Usui K, Hashiyada M, Hayashizaki Y, Igari Y, Hosoya T, Sakai J, et al. Application of modified QuEChERS method to liver samples for forensic toxicological analysis. Forensic Toxicol [Internet]. 2014 Aug 28 [cited 2014 Nov 28];32(1):139–47. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11419-013-0199-0>
16. Usui K, Hayashizaki Y, Hashiyada M, Funayama M. Rapid drug extraction from human whole blood using a modified QuEChERS extraction method. Leg Med (Tokyo) [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2012 Nov [cited 2014 Nov 28];14(6):286–96. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22682428>
17. Ministério da Saúde. Decreto-Lei nº 176/2006. Diário da República Série I. 2006;(167).
18. Merck. Manual Merck para a família [Internet]. 2009 [cited 2015 Apr 25]. Available from: <http://www.manualmerck.net/?id=31>
19. Infarmed. Prontuário Terapêutico - Nº11 - 2013. Infarmed, editor. 2012.

VII. Referências bibliográficas

20. Moffat A, Osselton MD, Widdop B, Watts J. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons: Volume 2. 4th ed. London: Pharmaceutical Press; 2011.
21. Repetto MR, Repetto M. Tabla de concentraciones de xenobioticos en fluidos biologicos humanos como referencia para el diagnostico toxicologico (actualización 2007). In: Repetto M, editor. Ampliación de Toxicologia de Postgrado. Sevilla: Area de Toxicologia Universidad de Sevilla; 2007. p. 1–72.
22. Barroso M, Gallardo E, Margalho C, Monsanto P, Vieira DN. Analytical approach to determine ticlopidine in post-mortem blood. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2006 Oct 16 [cited 2014 Nov 26];162(1-3):121–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16859849>
23. Kelder J., Funke C., Boer TD, Delbressine L., Leysen D., Nickolson V. A Comparison of the Physicochemical and Biological of Mirtazapine and Mianserin Properties. *J Pharm Pharmacol*. 1997;49:403–11.
24. Baselt RC. Disposition of toxic drugs and chemicals in man. 9th ed. California, USA: Biomedical Publications; 2011.
25. Infarmed. Resumo das características do medicamento: Haldol 1, 2, 5, 10 mg e 2mg/mL. 2012.
26. Martins RT, Almeida DB De, Monteiro FMDR, Kowacs PA, Ramina R. Receptores opioides até o contexto atual. *Rev Dor* [Internet]. 2012;13(1):75–9. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/rdor/v13n1/a14v13n1>
27. Bicca C, Ramos F, Campos V, Assis F, Pulchinelli Jr A, Lermnen Jr N, et al. Projeto Diretrizes: Abuso e Dependência dos Opioides e Opiáceos [Internet]. 2012. Available from: http://www.projetodiretrizes.org.br/diretrizes11/abuso_e_dependencia_de_opioides.pdf
28. Rosenblum A, Marsch L. Opioids and the treatment of chronic pain: controversies, current status, and future directions. *Exp Clin Psychopharmacol* [Internet]. 2008;16(5):405–16. Available from: <http://psycnet.apa.org/journals/pha/16/5/405/>
29. Infarmed. Resumo das características do medicamento: Gelotralib 50, 100, 150 e 200 mg cápsulas de libertação prolongada. 2014.
30. Guimarães S, Moura D, Silva PS da. Terapêutica medicamentosa e suas bases farmacológicas. 4th ed. Porto: Porto editora; 2006.
31. Javanbakht M, Attaran AM, Namjumanesh MH, Esfandyari-Manesh M, Akbari-Adergani B. Solid-phase extraction of tramadol from plasma and urine samples using a novel water-compatible molecularly imprinted polymer. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* [Internet]. Elsevier B.V.; 2010 Jun 15 [cited 2014 Nov 26];878(20):1700–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20452295>
32. MJ R, Jr. PW. Principles of Pharmacokinetics. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR et al., editor. *Holland-Frei Cancer Medicine* [Internet]. 6th ed. Hamilton (ON): BC Decker; 2003. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12815/>
33. Gan SH, Ismail R, Wan Adnan W a., Wan Z. Method development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for tramadol in human plasma using liquid-liquid extraction. *J Chromatogr B* [Internet]. 2002 May;772(1):123–9. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S157002320200065X>
34. Mannucci PM. Venous Thrombosis and Anticoagulant Therapy. *Br J Haematol*. 2001;114:258–70.
35. Hirsh J. Antithrombotic Therapy. In: Hematology AS of, editor. 50 years in hematology - Research that revolutionized patient care [Internet]. 2008. p. 1–36. Available from: <http://www.hematology.org/About/History/50-Years/1523.aspx>
36. Macedo T. Modificadores da hemostase. In: Guimarães S, Moura D, Silva PS da, editors. *Terapêutica Medicamentosa e suas bases farmacológicas*. 4ª ed. Porto: Porto Editora; 2006. p. 455–7.
37. Infarmed. Resumo das características do medicamento: Trazone 50 e 100 mg comprimidos. 2008.
38. Infarmed. Formulário Hospitalar Nacional de Medicamentos. 2006;191–211. Available from: <http://www.infarmed.pt/formulario/formulario.pdf>
39. Infarmed. Resumo das características do medicamento: Plaquetal 250mg comprimidos revestidos. 2011.
40. Berasaluce O, Baranda A, Hidalgo A, Alonso RM, Jimenez RM. Determination of Ticlopidine in Human Serum and Plasma by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Chromatographia* [Internet]. 2003;58(9):607–14. Available from: <http://link.springer.com/article/10.1365/s10337-003-0080-0#page-1>
41. Infarmed. Avaliação Biodisponibilidade/Bioequivalência [Internet]. 2015 [cited 2015 May 25]. Available from: http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MEDICAMENTOS_USO_HUMANO/AVALIACAO_TECNICO_CIENTIFICA/AVALIACAO_DISPONIBILIDADE_EQUIVALENCIA

VII. Referências bibliográficas

42. Moreno RA, Moreno DH, Soares MB de M. Psicofarmacologia de antidepressivos. *Rev Bras Psiquiatr* [Internet]. 1999;21:24–40. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1516-44461999000500006&script=sci_arttext
43. Malfará WR, Bertucci C, Costa Queiroz ME, Dreossi Carvalho SA, Pires Bianchi MDL, Cesarino EJ, et al. Reliable HPLC method for therapeutic drug monitoring of frequently prescribed tricyclic and nontricyclic antidepressants. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. 2007 Aug 15 [cited 2014 Nov 10];44(4):955–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17512687>
44. Vetulani J, Nalepa I. Antidepressants: past, present and future. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2000 Sep;405(1-3):351–63. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299900005653>
45. Florez J, Armijo JA, Mediavilla Á. *Farmacología humana*. 3rd ed. Barcelona, Spain: Masson, S.A.; 1997.
46. Infarmed. Resumo das Características do medicamento ADT 10, 25 ou 75 mg. 2010.
47. Infarmed. Resumo das características do medicamento: Ludiomil 10, 25, 50 e 75mg comprimidos revestidos por película. 2008.
48. Infarmed. Resumo das Características do medicamento Anafranil 25mg/2mL. 2014.
49. Infarmed. Resumo das Características do medicamento Mirtazapina ratiopharm 15, 30 ou 45 mg. 2014.
50. Hiemke C, Härtter S. Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacol Ther* [Internet]. 2000 Jan;85(1):11–28. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163725899000480>
51. Vaswani M, Linda FK, Ramesh S. Role of selective serotonin reuptake inhibitors in psychiatric disorders: a comprehensive review. *Prog Neuro-Psychopharmacology Biol Psychiatry* [Internet]. 2003 Feb;27(1):85–102. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S027858460200338X>
52. Romeiro LAS, Fraga CAM, Barreiro E. Novas Estratégias Terapêuticas para o Tratamento da Depressão: Uma Visão da Química Medicinal. *Quim Nov* [Internet]. 2003;26:347–58. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v26n3/15661.pdf>
53. Infarmed. Resumo das Características do Medicamento Fluoxetina Teva 20 mg. 2013.
54. Infarmed. Resumo das Características do Medicamento Zoloft 50 e 100 mg ou 20 mg/mL. 2015.
55. McIntyre IM, Mallett P. Sertraline concentrations and postmortem redistribution. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2012 Nov 30 [cited 2014 Nov 26];223(1-3):349–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23131307>
56. Infarmed. Resumo das Características do medicamento Citalopram Actavis 10,20,30 ou 40 mg. 2013.
57. Sadock B, Sadock V, Sussman N. *Manual de Farmacologia Psiquiátrica de Kaplan & Sadock*. 4th ed. 2007. 337-350 p.
58. Montgomery S. Serotonin noradrenaline reuptake inhibitors: Logical evolution of antidepressant development. *Int J Psychiatry Clin Pract* [Internet]. 2006 Jan [cited 2014 Nov 26];10 Suppl 2(Suppl 2):5–11. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24921676>
59. Dubey SK, Saha RN, Jangala H, Pasha S. Rapid sensitive validated UPLC–MS method for determination of venlafaxine and its metabolite in rat plasma: Application to pharmacokinetic study. *J Pharm Anal* [Internet]. Elsevier; 2013 Dec [cited 2014 Nov 26];3(6):466–71. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2095177913000567>
60. Vignali C, Morini L, Chen Y, Stramesi C, Groppi A. Distribution of venlafaxine and O-desmethylvenlafaxine in a fatal case. *Forensic Sci Int* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2014 Sep [cited 2014 Nov 26];242:e48–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25086830>
61. Infarmed. Resumo das Características do medicamento Efexor XR 37,5, 75 ou 150 mg. 2014.
62. Cantarelli MDG, Marcolin MA. Trazodona: Farmacologia e interações medicamentosas. *Rev Psiquiatr Clin* [Internet]. 2006;33(6):329–36. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/rpc/v33n6/06.pdf>
63. Voruganti LNP, Awad AG. Antipsychotic medications, schizophrenia and the issue of quality of life. In: Ritsner MS, Awad AG, editors. *Quality of Life Impairment in Schizophrenia, Mood and Anxiety Disorders* [Internet]. Springer; 2007. p. 307–19. Available from: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-1-4020-5779-3_16
64. Dolder C, Luna B. Psychopharmacology: A Pharmacodynamic Approach. In: Jeste DV., Friedman JH, editors. *Current Clinical Neurology: Psychiatry for Neurologists* [Internet]. Humana Press; p. 313–28. Available from: <https://books.google.pt/books?id=PgBvEk-0YWYC&pg=PA313&lpg=PA313&dq=Psychopharmacology:+A+Pharmacodynamic+Approach&source=bl&ots=1QX9SJaxzG&sig=RW9RWGuGRAJ5cP-ytjYkK7PYFLk&hl=pt->

VII. Referências bibliográficas

- PT&sa=X&ved=0CCQQ6AEwAGoVChMIjfeqi5KByAIVgVsUCh0w4g01#v=onepage&q=Psychop harm
65. Howard P, Twycross R, Shuster J, Mihalyo M, Wilcock A. Antipsychotics. *J Pain Symptom Manage* [Internet]. 2011 May [cited 2014 Nov 26];41(5):956–65. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21477976>
 66. Nobilis M, Vybíralová Z, Szotáková B, Sládková K, Kuneš M, Svoboda Z. High-performance liquid chromatographic determination of tiapride and its phase I metabolite in blood plasma using tandem UV photodiode-array and fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* [Internet]. 2011 Dec 15 [cited 2014 Nov 29];879(32):3845–52. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22100559>
 67. Infarmed. Resumo das características do medicamento: Nozinan 25 e 100mg comprimidos revestidos. 2014.
 68. Wohlfarth A, Toepfner N, Hermanns-Clausen M, Auwärter V. Sensitive quantification of clozapine and its main metabolites norclozapine and clozapine-N-oxide in serum and urine using LC-MS/MS after simple liquid-liquid extraction work-up. *Anal Bioanal Chem* [Internet]. 2011 May [cited 2014 Nov 26];400(3):737–46. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21394453>
 69. Infarmed. Resumo das características do medicamento: Tercian 100mg. 2012.
 70. Infarmed. Resumo das características do medicamento: Tiapridal 100mg. 2012.
 71. Infarmed. Resumo das características do medicamento: Clozapina Generis 25, 50 e 100 mg. 2012.
 72. Infarmed. Resumo das características do medicamento: Olanzapina APS 2.5, 5, 7.5, 10 mg. 2012.
 73. Benyamina A, Arbus C, Nuss P, Garay RP, Neliat G, Hameg A. Affinity of cyamemazine metabolites for serotonin, histamine and dopamine receptor subtypes. *Eur J Pharmacol* [Internet]. 2008 Jan 14 [cited 2014 Nov 29];578(2-3):142–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17936750>
 74. Dolinak D. *Forensic Toxicology, a physiologic perspective*. 1st ed. Canada: Academic Forensic Pathology Incorporated; 2013.
 75. Skopp G. Postmortem toxicology. *Forensic Sci Med Pathol* [Internet]. 2010 Dec [cited 2014 Nov 28];6(4):314–25. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20204545>
 76. Drummer OH. Postmortem toxicology of drugs of abuse. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2004 Jun 10 [cited 2014 Nov 28];142(2-3):101–13. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15172074>
 77. Gallardo E, Queiroz J a. The role of alternative specimens in toxicological analysis. *Biomed Chromatogr* [Internet]. 2008 Aug;22(8):795–821. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18506679>
 78. Butzbach DM. The influence of putrefaction and sample storage on post-mortem toxicology results. *Forensic Sci Med Pathol* [Internet]. 2010 Mar [cited 2014 Nov 28];6(1):35–45. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19946767>
 79. Jenkins AJ. *Drug testing in alternate biological specimens*. Jenkins AJ, editor. USA: Humana Press; 2008.
 80. Margalho C, Franco J, Corte-Real F, Vieira DN. Illicit drugs in alternative biological specimens: a case report. *J Forensic Leg Med* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011 Apr [cited 2014 Nov 28];18(3):132–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21420652>
 81. Wallace AD, Meyer SA. Hepatotoxicity. In: Ernest H, editor. *A Textbook of Modern Toxicology*. 4th ed. New Jersey: John Wiley & sons; 2010. p. 277–89.
 82. Hearn WL. Postmortem Toxicology. In: Karch SB, editor. *Drug Abuse Handbook*. USA: CRC Press; 1998.
 83. Mitra S. *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*. Winefordner JD, editor. New Jersey: Wiley-Interscience; 2003.
 84. Queiroz SCN, Collins CH, Jardim, Isabel CSF. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. *Quim Nov* [Internet]. 2001;24(1):68–76. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v24n1/4452.pdf>
 85. Jickells S, Negrusz A. *Clarke's Analytical Forensic Toxicology - Volume 1*. 3rd ed. London: Pharmaceutical Press; 2008.
 86. Wang Y. *Sample Preparation/Concentration for Trace Analysis in GC/MS (A study of solid phase microextraction and headspace sampling)*. 1997.
 87. Almeida C, Rosário P, Serôdio P, Nogueira JMF. Novas perspectivas na preparação de amostras para análise cromatográfica. *Química* [Internet]. 2004;95:69–77. Available from: <http://w3.ufsm.br/larp/media/3revport.pdf>
 88. Namera A, Yashiki M. Pretreatments of human specimens. In: Suzuki O, Watanabe K, editors. *Drugs and Poisons in Humans*. New York: Springer; 2005. p. 25–31.

VII. Referências bibliográficas

89. James C a., Breda M, Barattè S, Casati M, Grassi S, Pellegatta B, et al. Analysis of Drugs and Metabolites in Tissues and Other Solid Matrices. *Chromatographia* [Internet]. 2004 Apr 2 [cited 2014 Dec 5];59:149–56. Available from: <http://www.springerlink.com/index/10.1365/s10337-004-0197-9>
90. Plössl F, Giera M, Bracher F. Multiresidue analytical method using dispersive solid-phase extraction and gas chromatography/ion trap mass spectrometry to determine pharmaceuticals in whole blood. *J Chromatogr A* [Internet]. 2006 Nov 24 [cited 2014 Nov 28];1135(1):19–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17049535>
91. Namera A, Nakamoto A, Saito T, Nagao M. Colorimetric detection and chromatographic analyses of designer drugs in biological materials: a comprehensive review. *Forensic Toxicol* [Internet]. 2011 Jan 14 [cited 2014 Nov 27];29(1):1–24. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s11419-010-0107-9>
92. Anzillotti L, Odoardi S, Strano-Rossi S. Cleaning up blood samples using a modified “QuEChERS” procedure for the determination of drugs of abuse and benzodiazepines by UPLC-MS/MS. *Forensic Sci Int* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2014 Oct [cited 2014 Nov 27];243:99–106. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24907511>
93. Matsuta S, Nakanishi K, Miki A, Zaitzu K, Shima N, Kamata T, et al. Development of a simple one-pot extraction method for various drugs and metabolites of forensic interest in blood by modifying the QuEChERS method. *Forensic Sci Int* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2013 Oct 10 [cited 2014 Nov 28];232(1-3):40–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24053863>
94. Bang DY, Byeon SK, Moon MH. Rapid and simple extraction of lipids from blood plasma and urine for liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014 Feb 28 [cited 2014 Oct 28];1331:19–26. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24491523>
95. Minohata T, Kudo K, Usui K, Shima N, Katagi M, Ikeda N, et al. The Application of Ultra-Fast Triple Quadrupole LC-MS / MS to Forensic Analysis. *Shimadzu Rev* [Internet]. 2013;2–7. Available from: http://www.shimadzu.com/an/journal/selection/selection2-2_04.pdf
96. Hayes T, Kudo K, Minohata T, Usui K, Shima N, Katagi M, et al. Rapid screening and semi-quantitative analysis for forensic drugs in blood using liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry. Shimadzu. 2013;
97. Gradinaru J, Vulliou A, Eap CB, Ansermot N. Quantification of typical antipsychotics in human plasma by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for therapeutic drug monitoring. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014 Jan [cited 2014 Nov 26];88:36–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24036032>
98. Ansermot N, Brawand-Amey M, Kottelat A, Eap CB. Fast quantification of ten psychotropic drugs and metabolites in human plasma by ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for therapeutic drug monitoring. *J Chromatogr A* [Internet]. Elsevier B.V.; 2013 May 31 [cited 2014 Nov 26];1292:160–72. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23380367>
99. Hasselstrøm J. Quantification of antidepressants and antipsychotics in human serum by precipitation and ultra high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* [Internet]. 2011 Jan 1 [cited 2014 Nov 26];879(1):123–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21163713>
100. Ebrahimzadeh H, Yamini Y, Sedighi a, Rouini MR. Determination of tramadol in human plasma and urine samples using liquid phase microextraction with back extraction combined with high performance liquid chromatography. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* [Internet]. 2008 Mar 1 [cited 2014 Nov 18];863(2):229–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18272441>
101. Mastrogianni O, Theodoridis G, Spagou K, Violante D, Henriques T, Pouliopoulos a., et al. Determination of venlafaxine in post-mortem whole blood by HS-SPME and GC-NPD. *Forensic Sci Int* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2012 Feb 10 [cited 2014 Nov 17];215(1-3):105–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21641738>
102. Saar E, Gerostamoulos D, Drummer OH, Beyer J. Comparison of extraction efficiencies and LC-MS-MS matrix effects using LLE and SPE methods for 19 antipsychotics in human blood. *Anal Bioanal Chem* [Internet]. 2009 Jan [cited 2014 Nov 26];393(2):727–34. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19002441>
103. Plenis A, Bączek T. Modern chromatographic and electrophoretic measurements of antidepressants and their metabolites in biofluids. *Biomed Chromatogr* [Internet]. 2011 Jan [cited 2014 Dec 9];25(1-2):164–98. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21121008>
104. Shinozuka T, Terada M, Tanaka E. Solid-phase extraction and analysis of 20 antidepressant drugs in human plasma by LC/MS with SSI method. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2006 Oct 16 [cited 2014 Dec

VII. Referências bibliográficas

- 9];162(1-3):108–12. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0379073806003938>
105. Berzas Nevado JJ, Villaseñor Llerena MJ, Guiberteau Cabanillas C, Rodríguez Robledo V. Screening of citalopram, fluoxetine and their metabolites in human urine samples by gas chromatography-mass spectrometry. A global robustness/ruggedness study. *J Chromatogr A* [Internet]. 2006 Aug 4 [cited 2014 Nov 26];1123(1):130–3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16814307>
106. Pena A, Lino C, Silveira MIN. Determination of ticlopidine in human plasma by capillary gas chromatography with ion trap detection. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. 2003 Aug [cited 2014 Nov 26];32(4-5):879–85. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708503001900>
107. Hadidi K a, Almasad JK, Al-Nsour T, Abu-Ragheib S. Determination of tramadol in hair using solid phase extraction and GC–MS. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2003 Aug [cited 2014 Nov 16];135(2):129–36. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0379073803001968>
108. Verri P, Rustichelli C, Palazzoli F, Vandelli D, Marchesi F, Ferrari A, et al. Tramadol chronic abuse: An evidence from hair analysis by LC tandem MS. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. Elsevier B.V.; 2015 Jan [cited 2014 Nov 26];102:450–8. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0731708514004932>
109. Amundsen I, Oiestad ÅML, Ekeberg D, Kristoffersen L. Quantitative determination of fifteen basic pharmaceuticals in ante- and post-mortem whole blood by high pH mobile phase reversed phase ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* [Internet]. Elsevier B.V.; 2013 May 15 [cited 2014 Nov 26];927:112–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23380540>
110. Abolfazl S, Tahvilian R, Dehghani M. A Simple Sample Preparation with HPLC-UV Method for Estimation of Clomipramine from Plasma. 2010;9(January 2009):243–50.
111. Fisher DS, Partridge SJ, Handley S a, Couchman L, Morgan PE, Flanagan RJ. LC-MS/MS of some atypical antipsychotics in human plasma, serum, oral fluid and haemolysed whole blood. *Forensic Sci Int* [Internet]. Elsevier Ireland Ltd; 2013 Jun 10 [cited 2014 Nov 26];229(1-3):145–50. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23477803>
112. Patteet L, Maudens KE, Sabbe B, Morrens M, De Doncker M, Neels H. High throughput identification and quantification of 16 antipsychotics and 8 major metabolites in serum using ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta* [Internet]. Elsevier B.V.; 2014 Feb 15 [cited 2014 Nov 26];429:51–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24291056>
113. Patel BN, Sharma N, Sanyal M, Shrivastav PS. High throughput and sensitive determination of trazodone and its primary metabolite, m-chlorophenylpiperazine, in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* [Internet]. 2008 Aug 1 [cited 2014 Dec 9];871(1):44–54. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1570023208004613>
114. Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, Schenck FJ. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile. *J AOAC Int* [Internet]. 2003;86(2):412–31. Available from: <http://pubag.nal.usda.gov/pubag/downloadPDF.xhtml?id=555&content=PDF>
115. Zanella R, Prestes OD, Friggi C do A, Martins ML, Adaime MB. Modern Sample Preparation Methods for Pesticide Multiresidue Determination in Foods of Animal Origin by Chromatographic-mass Spectrometric Techniques [Internet]. *AcademyPublish.org*; p. 355–79. Available from: <http://www.academypublish.org/papers/pdf/88.pdf>
116. Kinsella B, Lehotay SJ, Mastovska K, Lightfield AR, Furey A, Danaher M. New method for the analysis of flukicide and other anthelmintic residues in bovine milk and liver using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chim Acta* [Internet]. 2009 Apr 1 [cited 2014 Nov 28];637(1-2):196–207. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19286030>
117. Restek. QuEChERS Methodology: AOAC Method [Internet]. 2012. p. 1–4. Available from: <http://www.restek.com/pdfs/805-01-002.pdf>
118. Corporation W. DisQuE - QuEChERS Simplified [Internet]. USA: Waters Corporation; 2012. Available from: www.waters.com/disque
119. Phenomenex. roQ™ QuEChERS Kits [Internet]. 2012 [cited 2014 Sep 16]. Available from: <http://www.allcrom.com.br/products/2012-05-22-18-21-25/roq-quechers.html>
120. Technologies A. Agilent QuEChERS Selection Guide [Internet]. USA; 2011. Available from: www.agilent.com/chem/sampleprep
121. Xiaoying Y, Prieto DA, Chan KC, Wei B-R, Blonder J. Tissue Sample Preparation for Proteomic Analysis. In: Issaq HJ, Veenstra TD, editors. *Proteomic and Metabolomic Approaches to Biomarker Discovery* [Internet]. Academic Press; 2013. p. 39–50. Available from: <https://books.google.pt/books?id=1nkGfsL7MtUC&pg=PA42&lpg=PA42&dq=Potter->

VII. Referências bibliográficas

- type+homogenizer&source=bl&ots=GYmse1qxoV&sig=qR9j9oXqSRYcifqIMaoKcs5kKJ8&hl=pt-PT&sa=X&ved=0CDQQ6AEwAmoVChMIXdG9zY3gxwIVRlsUCh2-AQKC#v=onepage&q=Potter-type homogenizer&f=false
122. Verollet R. A major step towards efficient sample preparation with bead-beating. *Biotechniques* [Internet]. 2008;44(6):832–3. Available from: <http://www.biotechniques.com/BiotechniquesJournal/2008/May/A-Major-Step-Towards-Efficient-Sample-Preparation-with-Bead-Beating/biotechniques-45298.html>
123. Technologies B. NEW GENERATION Tissue homogenizer [Internet]. 2007. Available from: [http://www.labmateasia.com/pdf/Homogenizer Brochure.pdf](http://www.labmateasia.com/pdf/Homogenizer%20Brochure.pdf)
124. Relacre. Guia Relacre 13 - Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química. 2000.
125. Peters FT, Maurer HH. Bioanalytical method validation and its implications for forensic and clinical toxicology - A review. *Accredit Qual Assur* [Internet]. 2002 Nov 1 [cited 2015 Jan 15];7(11):441–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00769-002-0516-5>
126. Bressolle F, Bromet-Petit M, Audran M. Validation of liquid chromatographic and gas chromatographic methods. Applications to pharmacokinetics. *J Chromatogr B Biomed Appl* [Internet]. 1996;686(1):3–10. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378434796000886>
127. Food and Drug Administration. Draft Guidance for Industry Bioanalytical Method Validation [Internet]. 2013. 34 p. Available from: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm368107.pdf>
128. EMEA. Guideline on bioanalytical method validation. 2012;44(July 2011). Available from: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf
129. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. 2001; Available from: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070107.pdf>
130. Peters FT, Drummer OH, Musshoff F. Validation of new methods. *Forensic Sci Int* [Internet]. 2007 Jan 17 [cited 2015 Jan 15];165(2-3):216–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16781833>
131. WADA. Identification Criteria for Qualitative Assays Incorporating Column Chromatography and Mass Spectrometry [Internet]. 2010. p. 1–9. Available from: <https://www.wada-ama.org/en/resources/science-medicine/td2010-idcr>
132. IPAC. Guia para a acreditação de laboratórios químicos OGC002. 2011;
133. Peters FT, Maurer HH. Review : Bioanalytical method validation – How , how much and why ? 1998;
134. Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF, Melo LFC. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim Nov* [Internet]. 2004;27(5):771–80. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v27n5/a17v27n5.pdf>
135. Ermer J, Miller JH. Method Validation in Pharmaceutical Analysis - A Guide to Best Practice. Ermer J, Miller JH, editors. 2005.
136. Bank D. Fentanyl [Internet]. [cited 2015 Mar 31]. Available from: <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00813>
137. Domańska U, Pelczarska A, Pobudkowska A. Solubility and pKa determination of six structurally related phenothiazines. *Int J Pharm* [Internet]. 2011 Dec 12 [cited 2015 Jan 15];421(1):135–44. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21983455>
138. Prestes OD, Friggi CA, Adaime MB, Zanella R. QuEChERS - Um método moderno de preparo de amostras para determinação multirresíduo de pesticidas em alimentos por métodos cromatográficos acoplados à espectrometria de massas. *Quim Nov* [Internet]. 2009;32(6):1620–34. Available from: http://quimicanova.sbq.org.br/imagebank/pdf/Vol32No6_1620_45-RV08484.pdf
139. Paschoal J a R, Rath S, Airolidi FPDS, Reyes FGR. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. *Quim Nova* [Internet]. 2008;31(5):1190–8. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v31n5/a48v31n5.pdf>
140. Ribeiro FADL, Ferreira MMC, Morano SC, Da Silva LR, Schneider RP. Planilha de validação: Uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. *Quim Nova* [Internet]. 2008;31(1):164–71. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v31n1/a29v31n1.pdf>
141. Ema. (R1), ICH Topic Q 2 Procedures:, Validation of Analytical Methodology, Text. Draft Guidel Report ... [Internet]. 2006;2(November 1994):1–15. Available from: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:European+Medicines+Agency#4>

VII. Referências bibliográficas

142. Hartmann C, Smeyers-Verbeke J, Massart D, McDowall R. Validation of bioanalytical chromatographic methods. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. 1998;17:193–218. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9638572>
143. Almeida a. M, Castel-Branco MM, Falcão a. C. Linear regression for calibration lines revisited: Weighting schemes for bioanalytical methods. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci* [Internet]. 2002;774(2):215–22. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12076691>
144. Gonçalves M, Camões MF, Paiva JM, Benoliel MJ, Carneiro RN. Validação do método de determinação simultânea dos íons brometo e bromato por cromatografia iônica em águas de consumo humano. *Quim Nov* [Internet]. 2004;27(3):503–7. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v27n3/20182.pdf>
145. Miller JN, Miller JC. *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. 2005.
146. ICH. Validation of Analytical Procedures: Text an Methodology Q2 (R1) [Internet]. 2005. Available from: http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf
147. Barroso M, Dias M, Vieira DN, López-Rivadulla M, Queiroz J a. Simultaneous quantitation of morphine, 6-acetylmorphine, codeine, 6-acetylcodeine and tramadol in hair using mixed-mode solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* [Internet]. 2010;396(8):3059–69. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20195584>
148. The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products. Note for Guidance on Validation of Analytical Procedures: Methodology. ICH; 1996. p. 9.
149. Maroto A, Riu J, Boqué R, Xavier Rius F. Estimating uncertainties of analytical results using information from the validation process. *Anal Chim Acta* [Internet]. 1999;391(2):173–85. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267099001117>
150. Maroto a., Boqué R, Riu J, Rius FX. Measurement uncertainty in analytical methods in which trueness is assessed from recovery assays. *Anal Chim Acta* [Internet]. 2001;440(2):171–84. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003267001010583>
151. Boqué R, Maroto A, Riu J, Xavier Rius F. Validation of analytical methods. *Grasas y Aceites* [Internet]. 2007;53(1):128–43. Available from: <http://grasasyaceites.revistas.csic.es/index.php/grasasyaceites/article/view/295/297>
152. Hughes NC, Wong EYK, Fan J, Bajaj N. Determination of carryover and contamination for mass spectrometry-based chromatographic assays. *AAPS J* [Internet]. 2007;9(3):E353–60. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2751487/pdf/12248_2008_Article_930353.pdf
153. Stevens J. The QuEChERS Approach to Determine Pharmaceuticals and Toxins in Whole Blood. Technologies, Agilent. 2011.
154. UCT. The Chemistry of QuEChERS (PWP) [Internet]. Available from: [http://www.achrom.be/userfiles/file/The Chemistry of QuEChERS - UCT - Achrom.pdf](http://www.achrom.be/userfiles/file/The%20Chemistry%20of%20QuEChERS%20-%20UCT%20-%20Achrom.pdf)
155. Chin C, Zhang ZP, Karnes HT. A study of matrix effects on an LC/MS/MS assay for olanzapine and desmethyl olanzapine. *J Pharm Biomed Anal* [Internet]. 2004;35(5):1149–67. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0731708504000093>
156. Garção R, Fonseca S, Costa S, Castañera A, Franco JM, Dias M. Otimização e validação de um método para triagem, confirmação e quantificação de 37 substâncias medicamentosas em amostras post-mortem por GC-MS. I Conferência INMLCF, IP. Coimbra; 2014.

VIII. Anexos



VIII. Anexos

1. Anexo A

1. Anexo A – Especificidade/Selectividade e Capacidade de Identificação: Interferentes

Tabela 27. Compostos analisados na avaliação de interferências na identificação dos analitos em estudo aquando da avaliação da especificidade/selectividade e da capacidade de identificação.

Compostos testados como possíveis interferentes	Anfetamina e metabolitos	Anfetamina Metanfetamina MDMA MDA	MBDB MDEA BZP	mCPP TFMPP Efedrina	PMA HMA HHMA
	Benzodiazepinas	Alprazolam Bromazepam Clobazam Clonazepam Clordiazepóxido Desmetilflunitrazepam Desalquilflurazepam Diazepam	Brotizolam Estazolam Flunitrazepam Flurazepam α -OH-Alprazolam Halazepam 2-OH-Etilflurazepam	α -OH-Midazolam α -OH-Triazolam Laprazolam Lormetazepam Midazolam Nordiazepam Oxazepam	Prazepam Temazepam Triazolam Zolpidem 7-aminoclonazepam 7-aminoflunitrazepam Demoxepam Lorazepam
	Canabinóides	THC		THCCOOH	11OHTHC
	Canabinóides sintéticos	JWH018 JWH073 JWH250 HU210	JWH018 N-(5-hidroxipentil) JWH018 N-ácido pentanóico JWH073 N-ácido butanóico	JWH073 N-(3-hidroxibutil) JWH122 N-(5-hidroxibutil) JWH210 N-ácido pentanóico	JWH210 N-(5-hidroxibutil) JWH250 N-(5-hidroxipentil) JWH250 N-ácido pentanóico
	Cocaína e metabolitos	Cocaína Benzoilecgonina	EME Cocaetileno	Cetamina Levamisole	Atropina
	Catinonas	Mefedrona		Catinona	
	Estimulantes sintéticos do tipo anfetamínico	2C-T2		2C-T4	2C-T7
	Pesticidas	Azinfos-etilo Bendiocarbe Cipermetrina Clorfenvinfos	Clorpirifos Deltrametrina Diazinão Dimetoato	Endossulfão Imidaclopride Malatião Ometoato	Paratião-etilo Quinalfos Tetraclorvinfos
	Opióides	Morfina Codeína	Fentanil	Metadona	6-acetilmorfina

VIII. Anexos

2. Anexo B

2. Anexo B – Especificidade/ Seletividade e Capacidade de Identificação: Amitriptilina

Tabela 28. Resultados obtidos para as amostras fortificadas com amitriptilina referentes ao estudo da especificidade/seletividade e da capacidade de identificação do método.

POOL 1							Controlo (pool 2)							Critérios								
	Área Abs	Área Rel	S/N	TRA	TRP	TRR		Área Abs	Área Rel	S/N	TRA	TRP	TRR	Rel.iónicas			S/N		ΔTR (2% rel. ou ± 1%)		ΔTRR (± 1% relativo)	
m/z 202	51513	100	107,6	16,474	18,67	0,882378	m/z 202	64559	100	84,4	16,474	18,67	0,88238	90	110	> 3	16,374	16,574	0,8736	0,8912		
m/z 215	25773	50,032	43,2	16,477	18,67	0,882539	m/z 215	32803	50,811	73,6	16,476	18,67	0,88249	40,811	60,811	> 3	16,376	16,576	0,8737	0,89131		
m/z 189	21440	41,6206	21,7	16,472	18,67	0,882271	m/z 189	28598	44,297	48,3	16,472	18,67	0,88227	35,438	53,157	> 3	16,372	16,572	0,8734	0,89109		
POOL 2							Controlo (Pool 1)							Critérios								
	Área Abs	Área Rel	S/N	TRA	TRP	TRR		Área Abs	Área Rel	S/N	TRA	TRP	TRR	Rel.iónicas			S/N		ΔTR (2% rel. ou ± 1%)		ΔTRR (± 1% relativo)	
m/z 202	64559	100	84,4	16,474	18,67	0,882378	m/z 202	51513	100	107,6	16,474	18,67	0,88238	90	110	> 3	16,374	16,574	0,8736	0,8912		
m/z 215	32803	50,8109	73,6	16,476	18,67	0,882485	m/z 215	25773	50,032	43,2	16,477	18,67	0,88254	40,032	60,032	> 3	16,377	16,577	0,8737	0,89136		
m/z 189	28598	44,2975	48,3	16,472	18,67	0,882271	m/z 189	21440	41,621	21,7	16,472	18,67	0,88227	33,296	49,945	> 3	16,372	16,572	0,8734	0,89109		
POOL 3							Controlo (Pool 1)							Critérios								
	Área Abs	Área Rel	S/N	TRA	TRP	TRR		Área Abs	Área Rel	S/N	TRA	TRP	TRR	Rel.iónicas			S/N		ΔTR (2% rel. ou ± 1%)		ΔTRR (± 1% relativo)	
m/z 202	59703	100	86,9	16,472	18,669	0,882318	m/z 202	51513	100	107,6	16,474	18,67	0,88238	90	110	> 3	16,374	16,574	0,8736	0,8912		
m/z 215	30739	51,4865	38,1	16,474	18,669	0,882425	m/z 215	25773	50,032	43,2	16,477	18,67	0,88254	40,032	60,032	> 3	16,377	16,577	0,8737	0,89136		
m/z 189	25811	43,2323	29,9	16,47	18,669	0,882211	m/z 189	21440	41,621	21,7	16,472	18,67	0,88227	33,296	49,945	> 3	16,372	16,572	0,8734	0,89109		
POOL 4							Controlo (Pool 1)							Critérios								
	Área Abs	Área Rel	S/N	TRA	TRP	TRR		Área Abs	Área Rel	S/N	TRA	TRP	TRR	Rel.iónicas			S/N		ΔTR (2% rel. ou ± 1%)		ΔTRR (± 1% relativo)	
m/z 202	74486	100	85,6	16,476	18,671	0,882438	m/z 202	51513	100	107,6	16,474	18,67	0,88238	90	110	> 3	16,374	16,574	0,8736	0,8912		
m/z 215	37970	50,976	60,5	16,479	18,671	0,882599	m/z 215	25773	50,032	43,2	16,477	18,67	0,88254	40,032	60,032	> 3	16,377	16,577	0,8737	0,89136		
m/z 189	30933	41,5286	31,3	16,476	18,671	0,882438	m/z 189	21440	41,621	21,7	16,472	18,67	0,88227	33,296	49,945	> 3	16,372	16,572	0,8734	0,89109		
POOL 5							Controlo (Pool 1)							Critérios								
	Área Abs	Área Rel	S/N	TRA	TRP	TRR		Área Abs	Área Rel	S/N	TRA	TRP	TRR	Rel.iónicas			S/N		ΔTR (2% rel. ou ± 1%)		ΔTRR (± 1% relativo)	
m/z 202	67969	100	59,8	16,477	18,67	0,882539	m/z 202	51513	100	107,6	16,474	18,67	0,88238	90	110	> 3	16,374	16,574	0,8736	0,8912		
m/z 215	34309	50,4774	49,7	16,48	18,67	0,8827	m/z 215	25773	50,032	43,2	16,477	18,67	0,88254	40,032	60,032	> 3	16,377	16,577	0,8737	0,89136		
m/z 189	27758	40,8392	25,9	16,476	18,67	0,882485	m/z 189	21440	41,621	21,7	16,472	18,67	0,88227	33,296	49,945	> 3	16,372	16,572	0,8734	0,89109		

VIII. Anexos

2. Anexo B

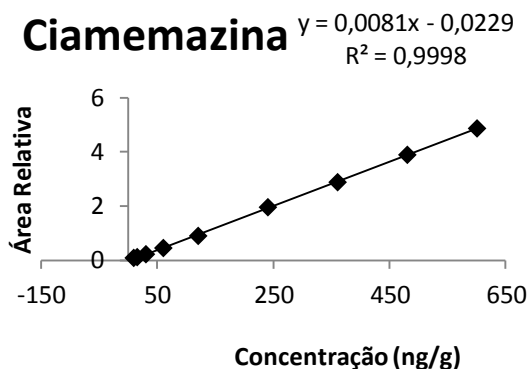
Tabela 29. Continuação dos resultados obtidos para as amostras fortificadas com amitriptilina referentes ao estudo da especificidade/seletividade e da capacidade de identificação do método.

Continuação

POOL 6							Controlo (Pool 1)							Critérios								
	Área Abs	Área Rel	S/N	TRA	TRP	TRR		Área Abs	Área Rel	S/N	TRA	TRP	TRR	Rel.iónicas			S/N		ΔTR (2% rel. ou ± 1%)		ΔTRR (± 1% relativo)	
m/z 202	68184	100	85,4	16,476	18,673	0,882343	m/z 202	51513	100	107,6	16,474	18,67	0,88238	90	110	> 3	16,374	16,574	0,8736	0,8912		
m/z 215	34580	50,7157	41	16,479	18,673	0,882504	m/z 215	25773	50,032	43,2	16,477	18,67	0,88254	40,032	60,032	> 3	16,377	16,577	0,8737	0,89136		
m/z 189	28103	41,2164	27	16,476	18,673	0,882343	m/z 189	21440	41,621	21,7	16,472	18,67	0,88227	33,296	49,945	> 3	16,372	16,572	0,8734	0,89109		
POOL 7							Controlo (Pool 1)							Critérios								
	Área Abs	Área Rel	S/N	TRA	TRP	TRR		Área Abs	Área Rel	S/N	TRA	TRP	TRR	Rel.iónicas			S/N		ΔTR (2% rel. ou ± 1%)		ΔTRR (± 1% relativo)	
m/z 202	66130	100	63,5	16,473	18,67	0,882325	m/z 202	51513	100	107,6	16,474	18,67	0,88238	90	110	> 3	16,374	16,574	0,8736	0,8912		
m/z 215	33634	50,8604	80,3	16,474	18,67	0,882378	m/z 215	25773	50,032	43,2	16,477	18,67	0,88254	40,032	60,032	> 3	16,377	16,577	0,8737	0,89136		
m/z 189	27525	41,6226	19,4	16,472	18,67	0,882271	m/z 189	21440	41,621	21,7	16,472	18,67	0,88227	33,296	49,945	> 3	16,372	16,572	0,8734	0,89109		
POOL 8							Controlo (Pool 1)							Critérios								
	Área Abs	Área Rel	S/N	TRA	TRP	TRR		Área Abs	Área Rel	S/N	TRA	TRP	TRR	Rel.iónicas			S/N		ΔTR (2% rel. ou ± 1%)		ΔTRR (± 1% relativo)	
m/z 202	77895	100	66,1	16,474	18,669	0,882425	m/z 202	51513	100	107,6	16,474	18,67	0,88238	90	110	> 3	16,374	16,574	0,8736	0,8912		
m/z 215	37856	48,5988	50,5	16,474	18,669	0,882425	m/z 215	25773	50,032	43,2	16,477	18,67	0,88254	40,032	60,032	> 3	16,377	16,577	0,8737	0,89136		
m/z 189	31175	40,0218	32,8	16,472	18,669	0,882318	m/z 189	21440	41,621	21,7	16,472	18,67	0,88227	33,296	49,945	> 3	16,372	16,572	0,8734	0,89109		
POOL 9							Controlo (Pool 1)							Critérios								
	Área Abs	Área Rel	S/N	TRA	TRP	TRR		Área Abs	Área Rel	S/N	TRA	TRP	TRR	Rel.iónicas			S/N		ΔTR (2% rel. ou ± 1%)		ΔTRR (± 1% relativo)	
m/z 202	61536	100	84	16,479	18,671	0,882599	m/z 202	51513	100	107,6	16,474	18,67	0,88238	90	110	> 3	16,374	16,574	0,8736	0,8912		
m/z 215	31234	50,7573	36,9	16,479	18,671	0,882599	m/z 215	25773	50,032	43,2	16,477	18,67	0,88254	40,032	60,032	> 3	16,377	16,577	0,8737	0,89136		
m/z 189	25023	40,664	32,6	16,476	18,671	0,882438	m/z 189	21440	41,621	21,7	16,472	18,67	0,88227	33,296	49,945	> 3	16,372	16,572	0,8734	0,89109		
POOL 10							Controlo (Pool 1)							Critérios								
	Área Abs	Área Rel	S/N	TRA	TRP	TRR		Área Abs	Área Rel	S/N	TRA	TRP	TRR	Rel.iónicas			S/N		ΔTR (2% rel. ou ± 1%)		ΔTRR (± 1% relativo)	
m/z 202	70771	100	57,6	16,475	18,671	0,882384	m/z 202	51513	100	107,6	16,474	18,67	0,88238	90	110	> 3	16,374	16,574	0,8736	0,8912		
m/z 215	36367	51,3869	43,5	16,475	18,671	0,882384	m/z 215	25773	50,032	43,2	16,477	18,67	0,88254	40,032	60,032	> 3	16,377	16,577	0,8737	0,89136		
m/z 189	30169	42,629	37,5	16,473	18,671	0,882277	m/z 189	21440	41,621	21,7	16,472	18,67	0,88227	33,296	49,945	> 3	16,372	16,572	0,8734	0,89109		

3. Anexo C – Tratamento estatístico no estudo da linearidade - Ciamemazina

	Concentração (ng/g)	Área analito	Área PI	Área relativa
Cal 1	9	1531	18039	0,084872
Cal 2	15	1952	16975	0,114993
Cal 3	30	4257	19253	0,221108
Cal 4	60	8457	18779	0,450343
Cal 5	120	18320	20413	0,897467
Cal 6	240	24816	12683	1,956635
Cal 7	360	62926	21844	2,8807
Cal 8	480	85731	22033	3,891027
Cal 9	600	96875	19908	4,866134



RESULTADO RESIDUAL			
Observação	Y previsto	Residuais	Residuais-padrão
1	0,050263	0,034609	1,233972
2	0,099071	0,015922	0,567684
3	0,221092	1,69E-05	0,000602
4	0,465133	-0,01479	-0,5273
5	0,953215	-0,05575	-1,98767
6	1,92938	0,027255	0,971777
7	2,905544	-0,02484	-0,88583
8	3,881709	0,009318	0,332237
9	4,857874	0,008261	0,294531



Estatística de regressão	
R múltiplo	0,999878
Quadrado de R	0,999756
Quadrado de R ajustado	0,999721
Erro-padrão	0,029983
Observações	9

ANOVA					
	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	25,79189	25,79189	28689,6	6,6E-14
Residual	7	0,006293	0,000899		
Total	8	25,79818			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior
Interceptar	-0,02295	0,01429	-1,60599	0,152312	-0,05674	0,010841
Variável X 1	0,008135	4,8E-05	169,3801	6,6E-14	0,008021	0,008248

Figura 16. Tratamento estatístico aplicado no estudo da linearidade (tendo como exemplo a ciamemazina).

4. Anexo D – Limite de Quantificação - Ciamemazina

- Confirmação qualitativa da presença de Ciamemazina no Calibrador mais baixo

INML, IP • SUL		Confirmação Qualitativa				
TOXICOLOGIA FORENSE						
Amostra:	Cal 0	Padrão Interno: Fentanil		Operador: DP		
Substância:	Ciamemazina	Controlo: CA 2		Data: Dia 5_Maio 2015		
Observações:						
Controlo: CA 2	lão	Área	Área relativa	Tolerância	limite inferior	limite superior
1º lão	58	633975	100,0%			
2º lão	323	69352	10,9%	5 abs.	5,9%	15,9%
3º lão	223	78839	12,4%	5 abs.	7,4%	17,4%
4º lão						
Ciamemazina (t.r.) =	23,04			0,1 abs.	22,938	23,138
Fentanil (t.r.) =	24,96	t.r.r. =	0,923	1% rel.	0,914	0,932
Amostra: Cal 0	lão	Área	Área relativa	Conformidade		
1º lão	58	15372	100,0%	conforme		
2º lão	323	1453	9,5%	conforme		
3º lão	223	1940	12,6%	conforme		
4º lão						
Ciamemazina (t.r.) =	23,05			conforme		
Fentanil (t.r.) =	24,97	t.r.r. =	0,923	conforme		

Figura 17. Confirmação qualitativa da presença de ciamemazina no calibrador mais baixo da gama de trabalho.

- Precisão e Exactidão

Tabela 30. Precisão (repetibilidade) e Exatidão determinada para a ciamemazina.

Substância	Concentração real (ng/g)	Concentração estimada (ng/g)	CV (%)	Critério	ERM (%)	Critério
Ciamemazina	9	9,57	5,73	<20%	6,38	<20%
	15	14,70	3,91		-1,98	
	30	28,73	3,26		-4,23	
	240	224,54	5,75		-6,44	
	600	553,98	8,52		-7,67	